

Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie der
Universität Marburg
Direktor: Prof. Dr. med. W. Schmid

Die Wirkung enzyminduzierender Pharmaka auf Gehalt, Eigenschaften und Matrizenfunktion von Leberchromatin

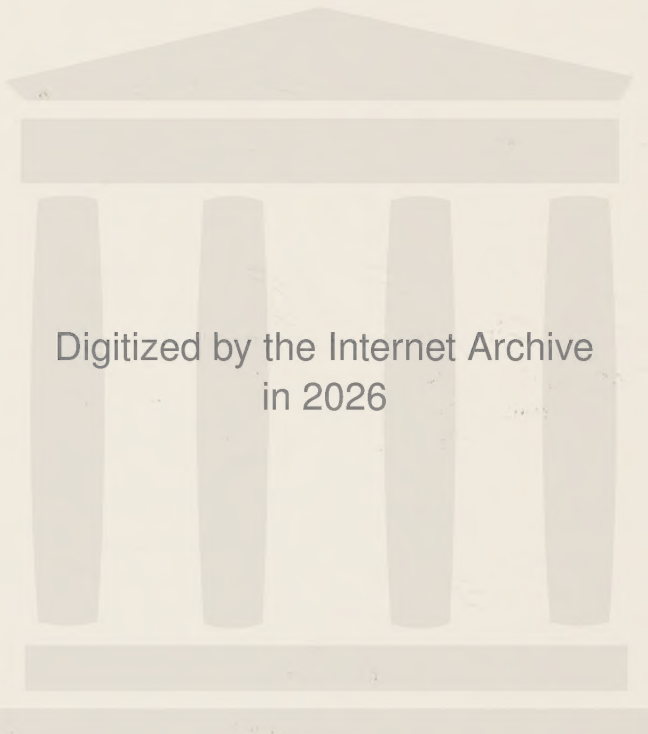
Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Humanbiologie
eingereicht dem Fachbereich Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Joachim Mierau
aus Bad Wildungen

Marburg/Lohn 1973

Fotodruck: Erich Mauersberger, Marburg



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie der
Universität Marburg
Direktor: Prof. Dr. med. W. Schmid

Die Wirkung enzyminduzierender Pharmaka auf Gehalt, Eigenschaften und Matrizenfunktion von Leberchromatin

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Humanbiologie
eingereicht dem Fachbereich Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Joachim Mierau
aus Bad Wildungen

Marburg/Lahn 1973

Fotodruck: Erich Mauersberger, Marburg



Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin
der Universität Marburg am 21.12.1973
gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs
Dekan: Prof. Dr. med. H. Oepen
Referent: Prof. Dr. med. W. Kunz
Correferent: Prof. Dr. med. W. Schmid

Die Arbeit wurde im Rahmen des Schwerpunkt-
programmes

"Biochemische Grundlagen der Arznei-
mittel- und Fremdstoffwirkung"

von der Deutschen Forschungsgemeinschaft
unterstützt.

Meiner Mutter
und dem Andenken meines Vaters

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1. <u>EINLEITUNG</u>	1
2. <u>MATERIAL UND METHODEN</u>	6
2.1. Chemikalien	6
2.2. Präparation, Reinigung und Aktivitätsbestimmung der DNS- abhängigen RNS-Polymerase (E. coli)	8
2.3. Tiermaterial und Tierhaltung	13
2.4. Applikation der Pharmaka	14
2.5. Präparation, Reinigung und Aktivitätsbestimmung von Leberchromatin	14
2.5.1. Organaufarbeitung	14
2.5.2. Chromatinpräparation nach HUANG et al. bzw. DAHMUS et al.	15
2.5.3. Chromatinpräparation nach MAYFIELD und BONNER	16
2.5.4. Bestimmung der Matrizenaktivi- tät des Chromatins	18
2.6. Isolierung von chromosomaler RNS	18
2.6.1. CsCl-Methode	20
2.6.2. DOC-Methode	21
2.6.3. NaCl-Methode	21
2.7. Methoden zur quantitativen Analyse und zur Charakterisierung der Chromatin- und Nucleinsäurefraktionen	22
2.7.1. DNS	23
2.7.2. RNS	24
2.7.3. Gesamtprotein	24
2.7.4. Histon- und Nichthistonprotein	25
2.7.5. UV-spektrometrische Bestimmungen	26
2.7.6. Bestimmung der Extinktionsänderung von Nucleinsäuren durch thermische Denaturierung (Schmelzkurven)	27
2.7.7. Basenanalyse	27
2.7.8. Dichtegradienten-Zentrifugation	28

2.7.8.1. Saccharose-Gradienten-zentrifugation	28
2.7.8.2. Caesiumchlorid-Gleichgewichtszentrifugation	29
2.7.9. Polyacrylamid-Gelelektrophorese/MAK-Chromatographie	29
2.7.10. Isotopenanalysen	30

3. EXPERIMENTELLE ERGEBNISSE

3.1. Analytische Daten von Leber-Chromatin	31
3.1.1. Vergleich der Chromatinausbeute bei Anwendung verschiedener Präparationsverfahren	31
3.1.2. Zusammensetzung von Chromatin nach MAYFIELD und BONNER	36
3.2. Bestimmung der Matrizenfunktion des Chromatins im in-vitro-System	37
3.2.1. Charakterisierung der Transcriptionskinetik	38
3.2.2. Matrizenaktivität der Chromatine nach HUANG/DAHMUS und MAYFIELD und BONNER	42
3.3. Untersuchung der Eigenschaften nicht sedimentierender Chromatinanteile	44
3.3.1. Matrizenaktivität	44
3.3.1.1. Ultrazentrifugation und Ultrafiltration von Überständen	45
3.3.1.2. Schmelzkurven	48
3.3.1.3. Alkal.Saccharosegradient	51
3.4. Beeinflussung von Chromatingehalten und Chromatineigenschaften durch in vivo-Applikation von Phenobarbital	54
3.4.1. Beeinflussung der Chromatingehalte	54
3.4.2. Beeinflussung der Chromatinzusammensetzung und -struktur	56
3.4.3. Beeinflussung der Matrizenaktivität	60
3.4.4. Bestimmung der Matrizenaktivität mit Rattenleberpolymerase	67
3.4.5. Wirkung von Phenobarbital auf Gehalte und Eigenschaften von Rattenleberchromatin	69
3.5. Untersuchungen zur Analyse der Transcriptionssteigerung von Leberchromatin Phenobarbital-induzierter Tiere	71
3.5.1. Wirkung von Phenobarbital in vitro	72
3.5.2. Beeinflussung der Transcription durch cytoplasmatische Fraktionen	73

3.5.3. Beeinflussung der Transcription durch Substanzen mit Redoxfunktion	76
3.5.3.1. Wirkung von Redoxindikatoren	76
3.5.3.2. Veränderung der $\text{NADP}^+/\text{NADP}\cdot\text{H}$ - Relation	78
3.5.4. Beeinflussung der Transcription durch "chromosomale RNS"	80
 4. <u>DISKUSSION</u>	
4.1. Eigenschaften und Funktion von Leberchromatin unbehandelter Tiere	84
4.2. Gehalte, Eigenschaften und Funktion von Leberchromatin während der Enzyminduktion durch Phenobarbital	88
4.3. Untersuchungen zum molekularen Mechanismus der Phenobarbital-Induktion	91
 5. <u>ZUSAMMENFASSUNG</u>	99
 <u>LITERATURVERZEICHNIS</u>	102

1. EINLEITUNG

Jede starke Induktion der endoplasmatischen Metabolisierungsenzyme der Leber durch Pharmaka oder Fremdstoffe hat eine der Induktionsintensität quantitativ entsprechende Vergrößerung der Leber zur Folge, die auf einer annähernd proportionierten Zunahme aller wesentlichen Zellbestandteile wie der Proteine, Struktur lipide und Nucleinsäuren beruht. Die Proteinzunahme ist ein Äquivalent des Gehaltsanstiegs umfangreicher cytoplasmatischer, mikrosomaler und mitochondrialer Enzymgruppen. Zeitpunkt und quantitativer Ausmaß des Anstiegs der einzelnen Enzyme sind dabei unterschiedlich; Sequenz und Verlauf zeigen jedoch gesetzmäßig die in Abb. 1 dargestellte Charakteristik.

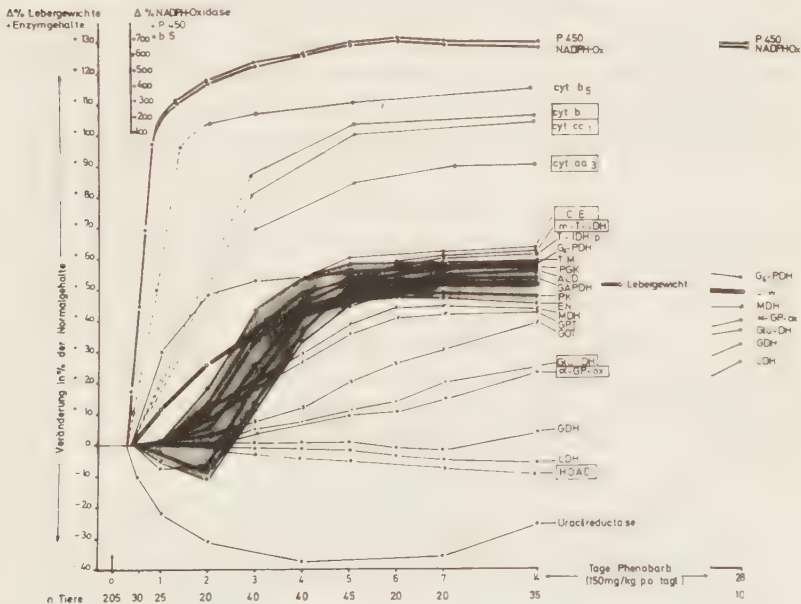


Abb. 1: Beeinflussung der Enzymgehalte und des Lebergewichts durch chronische Phenobarbitalapplikation (150 mg/kg p.o. tgl.) in % der Normalwerte.

Nach einer initialen steilen Aktivitätszunahme der mikrosomalen Enzyme steigen nach einer Latenzphase von 1 - 2 Tagen die extramikrosomalen Enzymgehalte bis zum Erreichen eines erhöhten Aktivitätsplateaus im Verlauf von 5 - 7 Tagen an. Die biologische und die vor allem interessierende toxikologische Bedeutung dieses Phänomens ist noch weitgehend unklar. Eine sichere Bewertung setzt detaillierte Kenntnisse der auslösenden Primärreaktion und der sich anschließenden Kausalkette voraus.

Unser Wissen über diese molekularen Mechanismen sind jedoch noch außerordentlich lückenhaft. Da alle das mikrosomale System induzierenden Substanzen Substrate der induzierten Enzyme sind oder zumindest an deren Substratbindungsorte gebunden werden, kann die Initialwirkung im Sinne des klassischen Regulationskonzepts von JACOB und MONOD (JACOB and MONOD, 1961), gedeutet werden. Es ist jedoch schwer möglich, die als Folgereaktion auftretende Aktivitätszunahme der extramikrosomalen Enzyme in gleicher Weise zu erklären. Von mehreren Autoren wurde die Gehaltszunahme dieser Enzyme deshalb nicht auf gesteigerte Neusynthese sondern auf eine Hemmung der katabolen Reaktionen des Enzymabbaus zurückgeführt. (SHUSTER et al. 1966; KURIYAMA et al. 1968).

Eingehende Analysen anderer Untersucher sicherten jedoch durch den Nachweis einer gesteigerten Inkorporation markierter Aminosäuren (SCHIMKE et al. 1968; ARIAS et al. 1969; GREIM et al. 1970; GEIBEL 1971) eine Steigerung von Synthese und Umsatz der mRNS-Fraktionen (KUNZ et al. 1970; GEIBEL 1971) und der Hemmbarkeit durch Inhibitoren der Protein- und Nucleinsäuresynthese (REICHWEIN, 1973), daß die Zunahme der mikrosomalen und extramikrosomalen Enzyme überwiegend auf einer Steigerung der Synthese beruht.

Es war schwer vorstellbar, daß die vermehrte Biosynthese großer Anteile des zellulären Enzymapparates durch diese heterogenen zellfremden Substanzen über spezifische Induktionsmechanismen erfolgt, wie es für einige Hormone nachgewiesen werden konnte (KARLSON, 1961; KARLSON und SEKERIS, 1966).

Hier mußten deshalb andere Wirkungsprinzipien angenommen werden. Zwei unterschiedliche Auslösemechanismen schienen möglich.

Es war einmal denkbar, daß der erhöhte Stoff- und Energiebedarf für Synthese, gesteigerte Funktion und Strukturhaltung des initial induzierten endoplasmatischen Enzymkomplexes eine wesentliche Vergrößerung des zellulären Synthese- und Energiebildungsapparates erfordert. Der sekundäre Anstieg der extramikrosomalen Enzyme wäre in diesem Falle lediglich Ausdruck der Adaption an eine erhöhte Funktion, die über die normalen Mechanismen der genetischen Regulation der Zelle erreicht wird. Dieses Konzept steht im Einklang mit einigen Befunden (MIEHE, 1967; KIRSECK, 1971). Gegen eine alleinige Bedeutung sprechen jedoch zahlreiche experimentelle Daten (PERAINO et al., 1964; PALM et al., 1967; MÖCKEL, 1972).

Als zweites mögliches Prinzip der Fremdstoffinduktion muß deshalb auch eine unmittelbare Wirkung der Pharmaka, ihrer Metabolite oder der mit der Metabolisierung verbundenen Stoffwechselprozesse auf das genetische Material oder die Regulation seiner Funktion diskutiert werden.

Die Steigerung der Enzymsynthesen könnte bei diesen beiden verschiedenen Auslöseprinzipien auf einer Vermehrung des Matrizenmaterials, auf einer erhöhten Derepression des vorhandenen Chromatins oder auf einer Stimulierung des Transcriptionsprozesses beruhen.

Nach den bisher vorliegenden experimentellen Daten ist eine Beteiligung aller dieser Mechanismen denkbar.

Eine gesteigerte DNS-Synthese und eine Überwiegend auf Polyploidisierung beruhende Erhöhung der DNS-Gehalte wurde nach Einwirkung aller lebervergrößernder Pharmaka gefunden (KUNZ et al., 1966 (I. u. II); SCHLICHT et al., 1968; SCHAUDE, 1972). Hinsichtlich Zeitpunkt und Ausmaß der DNS-Zunahme bestehen dabei zwischen den verschiedenen Substanzen erhebliche Unterschiede.

So scheinen Hexachlorcyclohexan (KORANSKY, 1970) und andere Halogenkohlenwasserstoffe (RÄKER, 1966; KUNZ et al., 1966) zu einer früher einsetzenden und stärker ausgeprägten DNS-Zunahme zu führen als Barbiturate.

Eine Stimulierung des Transcriptionsprozesses postulierten mehrere Untersucher aus der Steigerung der RNS-Polymeraseaktivität induzierter Rattenleber nach Applikation von 3-Methylcholanthren (GELBOIN et al., 1967; BRESNICK, 1966) und α -Hexachlorcyclohexan (OBERDISSE et al., 1970).

Bei He La-Zellen (GELBOIN et al., 1970) und in der Rattenleber (MADIX et al., 1967) wurde nach Induktion mit 3-Methylcholanthren zusätzlich eine Steigerung der Matrizenaktivität durch erhöhte Derepression von Genorten nachgewiesen (BRESNICK et al., 1969 und 1970).

3-Methylcholanthren induziert bei He La-Zellen ausschließlich, bei Leberzellen vorwiegend die mikrosomale Arylhydroxylase; die Gehalte der extramikrosomalen Enzyme, der Nucleinsäuren und die Zellgröße werden bei He La-Zellen gar nicht, bei Leberzellen nur wenig erhöht. Aus den mit 3-Methylcholanthren durchgeführten Analysen der Transcriptionsaktivierung kann also nur auf die molekularen Grundlagen der initialen Induktion der spezifischen Metabolisierungsenzyme geschlossen werden, nicht aber auf die in erster Linie interessierenden Mechanismen, die bei der Pharmakainduktion zur Synthese extramikrosomaler Enzyme und zum Zellwachstum führen.

Aus diesen bisher vorliegenden Befunden ist es wegen der Uneinheitlichkeit der induzierenden Substanzen, der untersuchten Zellarten und der unterschiedlichen Induktionsdauer zum Untersuchungszeitpunkt nicht möglich, ein allgemeingültiges Bild über die quantitative Bedeutung, die zeitliche Folge und die kausalen Beziehungen der einzelnen Faktoren zu gewinnen.

Aufgabe der vorliegenden Arbeit war es, an dem aus experimentellen Gründen sehr geeigneten Modell der durch Phenobarbital induzierten Synthese von Leberenzymen bei NMRI-Mäusen die Beeinflussung der Gesamtgehalte des Chromatins, seiner stofflichen Zusammensetzung, seiner Struktur und seiner Matrizenaktivität während des Induktionsverlaufs systematisch zu verfolgen.

Nach der Charakterisierung der Veränderung von Chromatineigenschaften und Chromatinfunktion bei der Induktion in vivo sollten aufgrund der dabei erhobenen Befunde in einer weiteren Versuchsreihe die Wirkungen der induzierenden Fremdstoffe sowie einiger bei in vivo-Induktion primär beeinflusster biologischer Zellkomponenten auf die Matrizenfunktion des Chromatins bei Zusatz zu einem Transcriptionssystem in vitro geprüft werden. Dadurch sollten erste Hinweise auf stoffliche oder funktionelle Prinzipien der Fremdstoffinduktion erhalten werden.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Chemikalien

Folgende Chemikalien wurden von der Fa. MERCK, Darmstadt, bezogen:

MnSO ₄	Phenobarbital-Na
CsCl	Rinderalbumin
NH ₄ Cl	Triton X 100
(NH ₄) ₂ SO ₄	Diphenylamin
FeCl ₃ · 6H ₂ O	Dioxan reinst
CuSO ₄ · 5H ₂ O	Toluol p.a.
MgCl ₂ · 6H ₂ O	Aethylenglycol
Harnstoff	Naphthalin für Scintillationsmessung
Ascorbinsäure	2,5-Diphenyloxazol (= PPO)
Orcin	2,2'-p-Phenylen-bis-(5-Phenyloxazol)
Mercaptoaethanol	(= POPOP) für Scintillationsmessung
Tris(hydroxymethyl)aminomethan p.a.	
EDTA = Titriplex ^R III = Aethylendiamintetraessigsäure-Dinatrium-Salz; Natriumdesoxycholat (= DOC); Saccharose für Bakteriologie puriss.; Folin-Ciocalteus-Phenolreagenz.	

Fa. SERVA, Heidelberg lieferte:

DNS aus Lachssperma; ATP, GTP, CTP
DOWEX 50 WX 4-400 mesh

Fa. HORMUTH-VETTER, Wiesloch:

Whatman DEAE-Zellulose DE 32
DEAE-Sephadex A 25

Fa. BOEHRINGER, Mannheim:

Glucose-6-phosphat	NADP ⁺
Glucose-6-phosphatdehydrogenase	NADP·H
α-Ketoglutar Säure	Kreatinphosphat
Glutamatdehydrogenase	Kreatinphosphokinase

¹⁴C-UTP (Uridin-4-¹⁴C-5' Triphosphat Ammoniumsalz)

50 m Ci/m mol (spezifische Aktivität)

50 u Ci/ml (Radioaktivitätskonzentration)

wurde vom Radiochemical Center, Amersham, England, über
Fa. BUCHLER, Braunschweig, bezogen.

Leberpolymerase A und B wurde freundlicherweise von Herrn
Prof. Dr. K. Seifart (Institut für Physiologische Chemie,
Marburg, Lahnberge) zur Verfügung gestellt.

Die für den Überwiegenden Teil der Versuche verwendete
Coli-Polymerase wurde von uns mehrfach aus E. coli,
Stamm K 12, enriched medium 3/4 log, (Fa. FALLEK Products
Co. Inc., New York) extrahiert und gereinigt.

2.2. Präparation, Reinigung und Aktivitätsbestimmung der DNS-abhängigen RNS-Polymerase. (E. coli)

Methoden zur Präparation der DNS-abhängigen RNS-Polymerase wurden bereits von HURWITZ (1962) und von CHAMBERLIN und BERG (1962) veröffentlicht. Nachstehend beschriebene Methodik basiert im wesentlichen auf der von ZILLIG (1966) veröffentlichten Polymerasepräparation aus *Escherichia coli*, ohne jedoch eine Sucrose-Gradienten-Elektrophorese einzuschließen. Die Präparation gliedert sich in vier verschiedene Reinigungsschritte, und zwar:

- 1) Zentrifugation bei verschiedenen Sedimentationsgeschwindigkeiten
- 2) Chromatographie über DEAE-Zellulose
- 3) Ammoniumsulfat-Fällung
- 4) Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation

2.2.1. Präparation und Reinigung des Rohhomogenates

Puffer CA pH 7.4: 50 mM Tris, 10 mM $MgCl_2$,
10 mM NH_4Cl , 0,5 mM EDTA,
1 mM Mercaptoaethanol

90 g *Coli*-Zellen und 70 g Puffer CA pH 7.4 wurden mit Glasperlen ($\phi = 0,11$ mm) auf ein Volumen von 250 ml aufgefüllt. Diese Mischung wurde in einer Schüttelmaschine mit Stahleinsatz (Fa. Otto BÜHLER, Tübingen) in mehreren Chargen jeweils 8 Minuten unter Kühlung (ca. $2^\circ C$) homogenisiert. Das Homogenat wurde 20 Minuten lang in einer Ultrazentrifuge MSE Superspeed 50 in einem 8×50 ml Winkelrotor bei $48.000 \times g$ zentrifugiert, wobei sich ein sehr festes Pellet ausbildete. Die vereinigten Überstände (= 80 ml Rohhomogenat) wurden erneut 90 Minuten lang in der Ultrazentrifuge in

einem 10 x 10 ml Winkelrotor bei 200.000 x g zentrifugiert. Es bildete sich ein deutliches Pellet aus, das u.a. die Mikrosomen enthielt. Die Überstände dieser Fraktion wurden nochmals 14 Stunden lang unter gleichen Bedingungen zentrifugiert. Das Sediment bestand aus zwei Schichten, dessen untere die restlichen Mikrosomen enthielt. Die gallertige obere Schicht, die aus DNS und Protein bestand, wurde mit dem Spatel abgehoben, in CA-Puffer aufgenommen und mit einem Glaspotter homogenisiert.

2.2.2. Säulen-Trennung über DEAE-Zellulose

Vorbehandlung des Säulenmaterials:

20 g trockene DEAE-Zellulose DE 32 wurden zum Aufquellen in 300 ml 0,5 N HCl eingerührt und 45 Minuten stehen gelassen. Der Überstand wurde dekantiert und die Zellulose so lange gewaschen, bis der Durchlauf einen pH-Wert von 4,0 erreicht hatte. Sodann wurde der gleiche Arbeitsgang mit 0,5 N NaOH wiederholt und die Zellulose bis zum Neutralpunkt gewaschen. Nach dem Entfernen der Feinanteile wurde die Zellulose mit CA-Puffer auf pH 7,4 äquilibriert. Der so vorbehandelten Zellulose wurde das DNS und Protein enthaltende Homogenat zugefügt und die Mischung unter zeitweiligem vorsichtigen Rühren 60 Min. lang stehen gelassen. Die Überstehende Flüssigkeit wurde mit einer Nutsche abgesaugt und die Zellulose zur Reinigung von störenden Proteinen zuerst mit 100 ml CA-Puffer und dann mit 100 ml CA-Puffer mit einer Ammoniumchloridkonzentration von 0,05 M gewaschen. Vor dem Packen der Säule (17 x 2,5 cm) wurde die Zellulose in 50 ml CA-Puffer (+ 0,05 M NH_4Cl) aufgenommen und in einer Druckflasche unter Wasserstrahlvakuum entgast. Die Säule wurde dann zunächst mit CA-Puffer, der 10 % Glycerin und 0,25 M NH_4Cl enthielt, eluiert und die Extinktion des Eluates bei 254 nm mit einer LKB-Uvicord-Einheit

gemessen und geschrieben. Die Fraktionen wurden mit dem Fraktionssammler LKB Ultrarac gesammelt. Es resultierte ein sehr scharfer Peak (s. Abb. 2), dessen gesamte Fraktionen gepoolt wurden. Die Säule wurde nacheluiert mit CA-Puffer mit 10 % Glycerin und einer Ammoniumchloridkonzentration von 0,4 M. Die Fraktionen des bei dieser Ionenstärke erhaltenen Peaks wurden ebenfalls gepoolt.

Um die Enzymaktivität in den Fraktionen der beiden Peaks zu testen, wurde ihre ^{14}C -UTP-Einbaurrate bestimmt (vgl. Methodik, Kap. 2.2.5). Da das Eluat der 0,25 M NH_4Cl -Konzentration gegenüber dem der NH_4Cl -Konzentration von 0,4 M eine um das zehnfach höhere Enzymaktivität zeigte, wurde zur weiteren Präparation nur das gepoolte Eluat mit diesen aktiven Fraktionen verwendet.

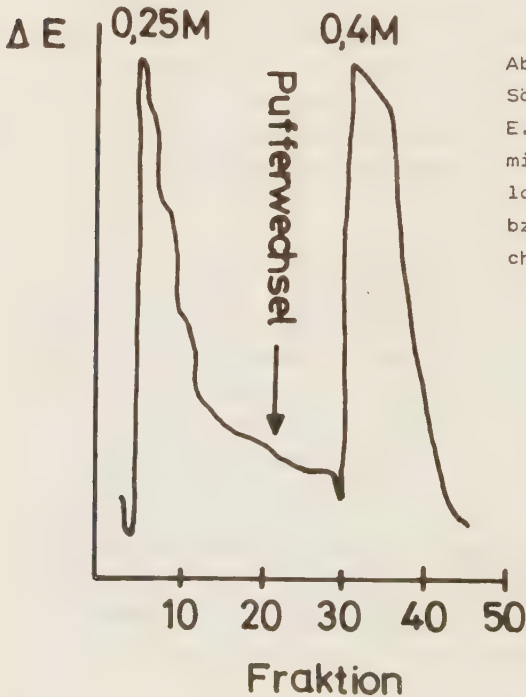


Abb. 2:
Säulentrennung von
E.coli-Rohhomogenat
mittels DEAE-Zellu-
lose DE 32 und 0,25
bzw. 0,4 M Ammonium-
chlorid.

2.2.3. Ammoniumsulfatfraktionierung

Das Säuleneluat der 0,25 M NH_4Cl -Konzentration wurde mit Ammoniumsulfat (50 %ige Sättigung) versetzt und nach 30-minütigem Stehenlassen in einer Zentrifuge der Fa. CHRIST 20 Minuten bei 4000 upm zentrifugiert. Das Sediment wurde in 4 ml CA-Puffer + 10 % Glycerin gelöst. Um "den kritischen Schritt der Ultrazentrifugation" (ZILLIG) zur Trennung des Enzyms von der stark konzentrierten Pufferlösung zu umgehen, wurde die Enzymsuspension in ausgekochten Schläuchen dialysiert, und zwar 2 Stunden lang gegen 3-mal 250 ml CA-Puffer ohne Glycerin.

2.2.4. Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation

Im wesentlichen wurde wie in Kap. 2.7.8.1. verfahren. 18 ml lineare Saccharosegradienten von 5 - 20 % (w/w). Saccharose, gelöst in CA-Puffer mit Zusatz von 10 % Glycerin, wurden mit 1,5 ml des Dialysats der Ammoniumsulfat-Fraktionierung überschichtet und 24 Stunden lang in einem Ausschwing-Rotor (3 x 20 ml) der MSE Super-speed 50 bei 130.000 x g max. zentrifugiert. Das Zentrifugenröhrchen wurde mit einem "tube piercer" der Fa. MSE angebohrt und der Inhalt mit den schweren Anteilen zuerst ausfließen lassen. Gemessen wurde in einer Durchflußküvette in einem Spektralphotometer PMQ II der Fa. ZEISS bei einer Wellenlänge von 280 nm. Die Fraktionen wurden 10-tropfenweise mittels eines LKB-Fraktionssammlers mit optischem Tropfenzähler gesammelt. Die Enzymaktivität wurde, wie folgt beschrieben, bestimmt. Die Fraktionen mit der höchsten Enzymaktivität und möglichst geringem Anteil von störenden Begleitproteinen wurden gepoolt und in kleinen Teilmengen bei

- 25° C aufbewahrt. Abb. 3 zeigt die Verteilung der Enzym-aktivität und des Proteingehaltes in den Fraktionen nach Saccharosegradienten-Zentrifugation.

Sämtliche Präparationsschritte wurden im Kühlhaus bei + 5° C, die Ultrazentrifugation bei + 4° C, durchgeführt.

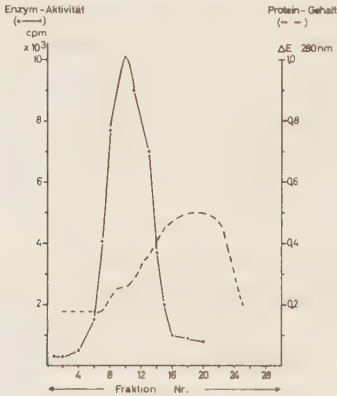
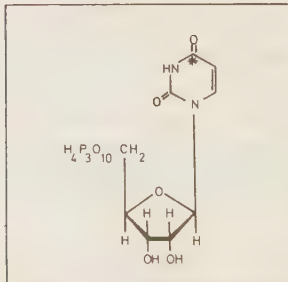


Abb. 3:
Enzym-Aktivität und
Protein-Gehalt nach
Saccharose-Gradienten-
zentrifugation.

2.2.5. Bestimmung der Polymerase-Aktivität

Als Maß für die Enzymaktivität diente der Einbau von ¹⁴C-markiertem UTP in die in vitro zu synthetisierende RNS.

[¹⁴C]* Uridintriphosphat
[¹⁴C] UTP



Zur Verwendung kam das von LUKACS und SEKERIS (1967) vorgeschlagene Testsystem. Es bestand aus:

Jeweils 0,25 μMol ATP, GTP und CTP, 0,1 μCi ^{14}C UTP, 2,5 Molen Kreatinphosphat, 5 μg Kreatinphosphokinase, 3 μMolen Mercaptoäthanol, 2 μMolen MnSO_4 und 12 μMolen Tris pH 7.9 in einem Endvolumen von 0,15 ml.

Als Matrize diente 60 μg DNS aus Lachssperma.

Bei zu vergleichenden Proben wurde die Polymerase enthaltende Lösung in jeweils gleichen Volumina (0,05 ml) zuletzt dem Testansatz zugegeben. Die Probe wurde in Mikrogefäßen mit Hilfe eines Thermoblocks (beides von der Fa. EPPENDORF, Hamburg) unter Schütteln bei 37° inkubiert. Nach 30 Minuten wurden dem Testansatz 0,05 ml entnommen und auf Filtrierpapierquadrate vom Durchmesser 2,5 cm aufgetropft (Papier: Schleicher und Schüll 2043 b). Sobald die Flüssigkeit eingezogen war, wurde das Filtrierpapier in eiskalte 5 %ige HClO_4 geworfen, 30 Minuten dort belassen und zweimal mit 5 %iger HClO_4 , danach mit Äthanol/Äther (1:1, v/v) und schließlich mit Äther gespült. Nach dem Trocknen wurden die Filtrierpapierplättchen in Scintillatorflaschen überführt, die 15 ml Scintillationsflüssigkeit, bestehend aus 5 g PPO und 0,1 g POPOP pro Liter Toluol, enthielten. Nachdem die Proben ausreichend (mindestens 6 Stunden) adaptiert waren (Dunkelheit und Temperatur, 4°C), wurde die Radioaktivitätsmessung in einem Flüssigkeitsscintillationszähler MARK I der Fa. NUCLEAR, Chicago, vorgenommen.

2.3. Tiermaterial und Tierhaltung

Für die tierexperimentellen Untersuchungen waren ausschließlich männliche Albinomäuse des NMRI-Stammes sowie männliche Albinoratten "Sprague Dawley", beide aus der Versuchstierzuchtanstalt IVANOVAS, Kisslegg/Allgäu, eingesetzt. Mäuse wurden in Gruppen von maximal 10 Tieren bzw. bei Applikation von Phenobarbital wegen der auf Substanz-

wirkung beruhenden Excitation und dadurch bedingten erhöhten Aggressivität der Tiere in Gruppen von 5, Ratten in Gruppen von maximal 3 Tieren in durchsichtigen Makrolonkäfigen gehalten. Die Tiere waren in vollklimatisierten Räumen (23 - 24° C Raumtemperatur) mit künstlichem, konstantem Hell-Dunkel-Rhythmus untergebracht und wurden mit Preßfutter Altromin der Fa. ALTROGGE, Brackwede, und Leitungswasser aus Saugflaschen ad libitum ernährt. Nach Eintreffen vom Züchter konnten sie sich 14 Tage an die Stall- und Ernährungsbedingungen des Institutes gewöhnen, bevor sie zu Versuchen eingesetzt wurden.

2.4. Applikation der Pharmaka

Phenobarbital-Na wurde den Tieren im Trinkwasser zu 0,1 % gelöst, verabreicht. Das entspricht bei einer durchschnittlichen täglichen Trinkmenge von 4 ml pro Maus einer Dosierung von 150 mg Phenobarbital-Na/kg Körpergewicht bei einem Tiergewicht von durchschnittlich 25 g. Die Tiere wurden, wenn nicht jeweils anders vermerkt, 36 Stunden lang mit Phenobarbital-Na induziert.

2.5. Präparation von Leberchromatin

2.5.1. Organaufarbeitung

Die Tötung der gewogenen Tiere erfolgte durch Dekapitation. Die Leber wurde nach gutem Ausbluten der Tiere entnommen, nach dem Entfernen der Gallenblase gewogen und sofort in eiskaltem Puffer A bzw. Wasser aufgenommen.

Puffer A pH 7.6: 0,25 M Saccharose, 0,025 M KCl,
0,01 M $MgCl_2$, 0,05 M Tris/HCl pH 7.6

Die weitere Fraktionierung der Leber zur Präparation von

Chromatin entsprechend der grundlegenden Methode von BONNER nach den modifizierten Vorschriften von HUANG et al. (1969) und DAHMUS et al. (1969) bzw. MAYFIELD und BONNER (1971) vorgenommen.

2.5.2. Chromatinpräparation nach HUANG et al. (1969) bzw. DAHMUS et al. (1969)

Der Präparation von Leberchromatin aus unfractioniertem Ganzgewebe lag die modifizierte Vorschrift von HUANG et al. (1969) unter Anwendung der weiteren Reinigung nach DAHMUS et al. (1969) zugrunde.

Die zerschnittene Leber wurde unter Eiskühlung mit dem 15-fachen Volumen des Lebergewichtes mit destilliertem Wasser gepottert. Verwendet wurde ein Glashomogenisator mit Teflonstempel nach POTTER/ELVEHJEM der Fa. BRAUN, Melsungen. Das Homogenat wurde in einer Zentrifuge der Fa. CHRIST 15 Minuten lang bei 1500 x g zentrifugiert. Das Sediment wurde im gleichen Volumen Wasser resuspendiert und nach dem Homogenisieren durch zwei Lagen Mull filtriert. Das Filtrat wurde nochmals 15 Minuten bei 1500 x g zentrifugiert. Das Sediment wurde in 20 ml pro Leber 0,01 M Tris-Puffer pH 8,0 aufgenommen und 30 Minuten lang mit einem Magnetrührer langsam gerührt. Nach 15-minütiger Zentrifugation bei 10.000 x g wurde das Sediment wiederum mit 20 ml 0,01 M Tris-Puffer pH 8,0 homogenisiert und 15 Min. bei 10.000 x g zentrifugiert. Dieser Waschvorgang wurde 3-mal wiederholt. Das Pellet (= Rohchromatin) wurde ad 10 ml in 0,01 M Tris-Puffer pH 8,0 homogenisiert und bei + 5° C aufbewahrt bzw. gereinigt.

Wegen der geringen Matrizenaktivität des Chromatins dieser Präparationsmethode war eine Reinigung mittels Saccharosegradienten-Zentrifugation unabdinglich.

2.5.4. Bestimmung der Matrizenaktivität des Chromatins

Zur Bestimmung der Matrizenaktivität des isolierten Chromatins diente das gleiche Testsystem und die gleiche Testmethode wie zur Ermittlung der Polymerase-Aktivität (Kap. 2.2.5.). Anstelle von Lachssperma-DNS wurde 0,1 ml der zu untersuchenden Chromatinlösung dem Testansatz zugesetzt. Das Synthesystem wurde nur in der Weise modifiziert, daß die Aktivität der DNS-Matrize und nicht der Polymerase reaktionslimitierender Faktor war. Deshalb wurde RNS-Polymerase im Überschuß zugegeben. Der DNS-Gehalt des Chromatins betrug, wie in Kap. 3.2.1. näher begründet, maximal 60 µg/Ansatz. Um die Aktivität verschiedener Chromatine vergleichen zu können, wurde für jede Versuchsreihe die gleiche Enzympräparation eingesetzt. Um zeitlich auseinanderliegenden Versuche zu relativieren, wurde, falls erforderlich, die spezifische Aktivität der Polymerase durch Parallelansätze mit Lachssperma-DNS bestimmt.

2.6. Isolierung von chromosomaler RNS

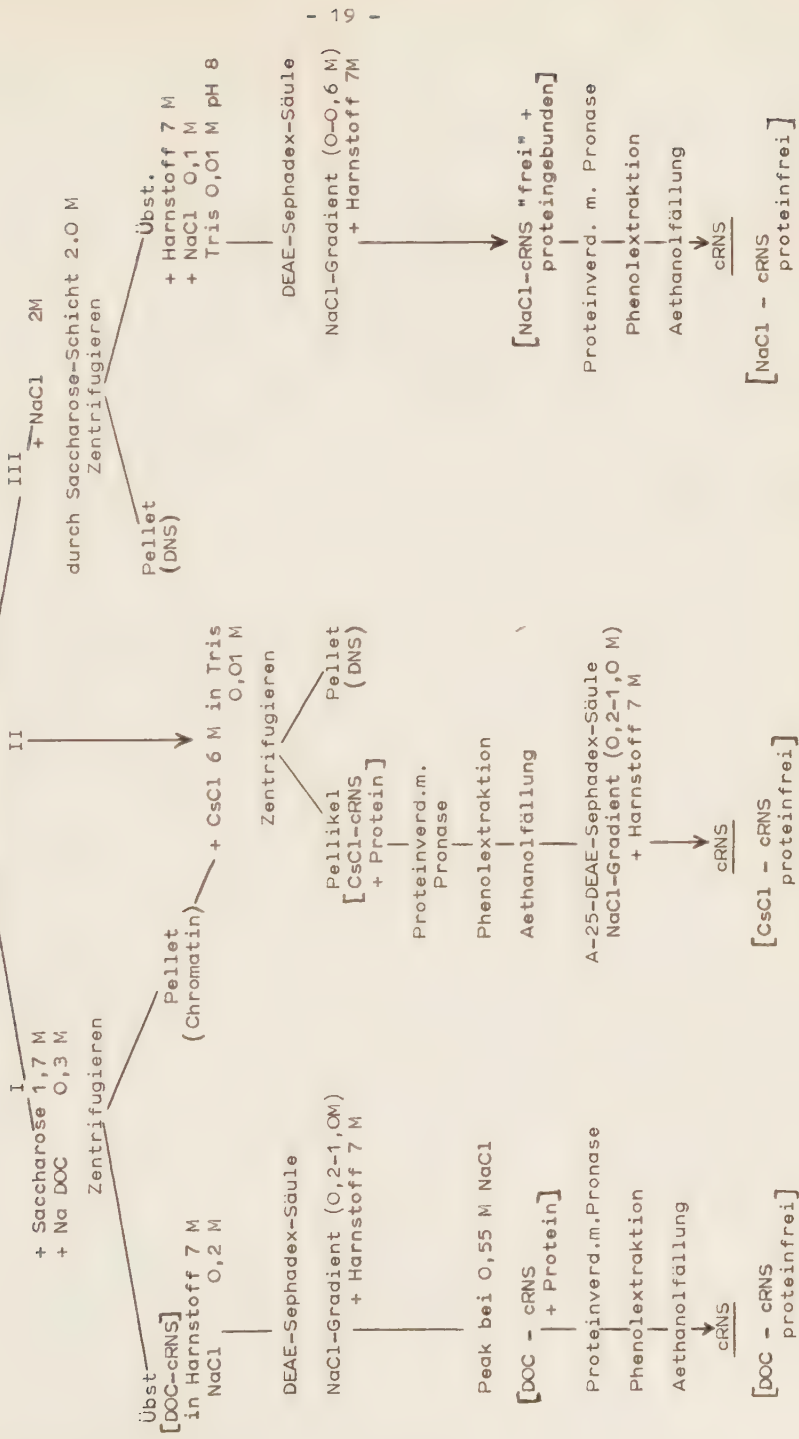
Die von BONNER beschriebene "chromosomale RNS" (= cRNS) wurde aus Rohchromatin nach den folgenden, von BONNER und Mitarbeitern angegebenen Präparationsmethoden isoliert.

- I MAYFIELD und BONNER (1971 und 1972)
- II BONNER und WIDHOLM (1967); DAHMUS und McCONNELL (1969)
- III JACOBSON und BONNER (1971)

Die sich ergänzenden Schritte dieser Verfahren wurden in sinnvoller Weise entsprechend dem nachfolgend angegebenen Präparationsschema kombiniert.

Ausgangsmaterial:

ROHCHROMATIN



tet und 18 Stunden lang bei 105.000 x g zentrifugiert. Histone, "freie" und "gebundene" cRNS verblieben über dem Saccharosepolster, während DNS am Boden pelletierte. Der Überstand wurde mit 7 M Harnstoff in 0,01 M Tris-Puffer pH 8,0 zwanzigfach auf eine NaCl-Konzentration von 0,1 M verdünnt, anschließend über DEAE-Sephadex mit einem NaCl-Gradienten 0 - 0,6 M in 7 M Harnstoff, wie oben beschrieben, chromatographiert und gereinigt. Mit diesem Verfahren wird nach BONNER gebundene und ungebundene cRNS erhalten. (NaCl-cRNS) Sie kann durch Pronaseverdauung von Protein getrennt werden (NaCl-cRNS proteinfrei).

2.7. Methoden zur quantitativen Analyse und zur Charakterisierung der Chromatin- und Nucleinsäurefraktionen

Die für die Chromatinpräparation verwendeten Puffer enthielten Saccharose, die bei den DNS-, RNS- und Proteinbestimmungen störend wirkte. Zur quantitativen Bestimmung von Überstandsfraktionen und gereinigtem Chromatin wurde durch Fällern und mehrmaliges Waschen der gefällten Nucleinsäuren und Proteine die störende Saccharose entfernt. Nach dem Waschen wurde das Sediment hydrolysiert und zentrifugiert. Der Arbeitsgang geht aus nachfolgendem Schema hervor.

Vorbehandlung saccharosehaltiger Proben:

3 ml DNS, RNS und Protein enthaltende Probe + 3 ml 1N HClO_4

zentrifugieren (25'; 15.000 x g)

Überstand verwerfen

Sediment (DNS, RNS, Protein) + 6 ml 0,5 N HClO_4

zentrifugieren wie oben,

Überstand verwerfen

Sediment (DNS, RNS, Protein + 6 ml 0,5 N HClO_4

hydrolysieren (15' 90° C)

zentrifugieren wie oben

Überstand: DNS
RNS

Sediment: Protein

Das Sediment wurde zur Proteinbestimmung verwendet, aus den Überständen wurde der DNS- bzw. RNS-Gehalt ermittelt.

2.7.1. DNS

Quantitative DNS-Bestimmung nach BURTON (1956).

BURTON-Reagens:

3 g Diphenylamin in 200 ml Eisessig gelöst, dazu 3 ml konz. H_2SO_4 p.a.;

vor der Messung werden zu je 20 ml dieser Lösung 0,1 ml einer 1,6 %igen (w/v) Acetaldehydlösung gegeben.

1 ml des DNS-haltigen Überstandes wurde mit dem zweifachen Volumen BURTON-Reagens versetzt und 14 - 20 Stunden bei einer Temperatur von 30° C gehalten. Danach wurde die Extinktion der Probe bei 578 nm im Photometer PMQ II (ZEISS)

gemessen. Der DNS-Gehalt der Fraktion wurde aus der Extinktion anhand einer Eichkurve ermittelt. Als Eichsubstanz diente DNS aus Lachssperma, die in unterschiedlichen Mengen nach BURTON bestimmt wurde.

2.7.2. RNS

Quantitative RNS-Bestimmung mit der Orcinmethode nach MEYBAUM (1939).

Orcin-Reagens:

100 mg $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ in 100 ml HCl (D 1,19) gelöst, dazu 3,5 ml einer 6 %igen Orcinlösung in 90 %igem Aethanol (unvergällt).

1 ml des nach der Vorbehandlung saccharosehaltiger Proben anfallenden Überstandes wurden mit 2 ml Orcin-Reagens versetzt und 15' im Wasserbad auf 100°C erhitzt. Anschließend wurde die Probe in Eiswasser abgekühlt und deren Extinktion bei 665 nm im Photometer PMQ II (ZEISS) gemessen. Unter Verwendung des von SCHULZ (1967) angegebenen Extinktionsfaktors wurde der RNS-Gehalt nach folgender Formel ermittelt:

$$\frac{E_{665} \cdot 92,5 \cdot \text{Hydrolysevolumen}^+}{\text{Einsatzvolumen}^+} = \mu\text{g RNS/Probe}$$

+) Es wurden die Volumina zur Vorbehandlung saccharosehaltiger Proben zugrunde gelegt.

2.7.3. Gesamt-Protein

Gesamtprotein wurde anfänglich nach einer modifizierten Biuretmethode bestimmt (BEISENHERZ, 1953).

Den überwiegenden Bestimmungen lag die Vorschrift von LOWRY et al. (1951) zugrunde. Saccharose störte bei dieser Methode nicht.

LOWRY-Reagenzien:

Lösung A : 2 % Na_2CO_3

B₁: 1 % CuSO_4 (. $5\text{H}_2\text{O}$) B₂ : 2 % K-Na-tartrat

B : ana partes B₁ und B₂ vor Gebrauch mischen

C : 50 ml Lösung A und 1 ml Lösung B unmittelbar vor Gebrauch mischen

D : 1,0 ml FOLIN-CIOCALTEUS-Phenolreagens mit 1,36 ml dest. Wasser auf eine Konzentration von 1 N bringen

E : 0,1 % Rinderalbumin (MERCK)

F : 5 % Natriumdesoxycholat

(jeweils wässrige Lösungen)

0,3 ml Probe wurden mit 0,1 ml Lösung F versetzt, um, wenn vorhanden, einen proteinhaltigen Niederschlag in Lösung zu bringen. Mit dest. Wasser wurde auf ein Gesamtvolumen von 1 ml aufgefüllt. Nach Zugabe von 4 ml Lösung C wurde das Gemisch 10 Minuten lang stengelassen, danach mit 0,5 ml Lösung D versetzt und kurz und kräftig gemischt. Nach 30 Minuten wurde die Extinktion bei 660 nm im Photometer PMQ II (ZEISS) gegen einen Leerwert, bestehend aus 1 ml des Puffers, in dem die jeweilige Proteinprobe gelöst war - übriger Ansatz wie oben angegeben - gemessen. Der Proteingehalt wurde aus der Extinktion anhand einer Eichkurve ermittelt. Als Eichsubstanz diente Rinderalbumin (Lösung E), das in definierten Mengen in einem Gesamtvolumen von 1 ml, wie oben beschrieben, behandelt wurde und dessen Extinktionswerte der Eichkurve zugrunde lagen.

2.7.4. Histon- und Nichthiston-Protein

Zur quantitativen Bestimmung von Histon- und Nichthiston-Protein wurde zuerst das Gesamtprotein in diese beiden Komponenten getrennt. Als Ausgangsmaterial diente 1 ml gereinigtes oder Rohchromatin, das mit dem gleichen Volumen 0,4 N H_2SO_4 (Endkonzentration 0,2 N H_2SO_4) versetzt und

1 Stunde bei 4°C langsam gerührt wurde. Nach dem Zentrifugieren ($25'$; $15.000 \times g$) befanden sich Nichthistone im Sediment und Histone im Überstand. Dieser Überstand wurde mit dem gleichen Volumen 40 %iger Trichloressigsäure (Endkonzentration 20 %) versetzt und zentrifugiert ($25'$; $15.000 \times g$). Der dabei entstehende Niederschlag wurde in 2,9 ml 0,1 N NaOH + 0,1 ml 5 %iger DOC-Lösung aufgenommen und die Histone nach LOWRY bestimmt.

Das Nichthistonproteine enthaltende Sediment nach H_2SO_4 -Fällung wurde in 0,5 N HClO_4 aufgenommen und 15 Minuten bei 90°C hydrolysiert. Nach dem Zentrifugieren ($25'$; $15.000 \times g$) entstand ein Sediment, das zur Bestimmung des Gehalts an Nichthiston-Proteinen nach LOWRY in 2,9 ml 0,1 N NaOH + 0,1 ml 5 % DOC-Lösung aufgenommen wurde.

Es bestand die Möglichkeit, die Nucleinsäuren, die sich im Überstand befanden, nach BURTON (DNS) bzw. nach der Orcinmethode (RNS) quantitativ zu bestimmen.

2.7.5. UV-spektrometrische Bestimmungen

Zur schnellen Orientierung über die Chromatin- bzw. Nucleinsäureausbeute während des Präparationsvorgangs wurden UV-Spektren im Bereich zwischen 220 und 320 nm aufgenommen. Wegen des unterschiedlichen Hyperchromasiegrades der verschiedenen Präparationen ergibt dieses Verfahren nur Anhaltswerte. Durch Vergleich der mit spezifischen Methoden bestimmten exakten Gehalte mit den UV-Extinktionen wurden für die interessierenden Fraktionen bei Verwendung von 1 cm Küvetten folgende Umrechnungsfaktoren erhalten:

RNS: E_{260} . 48,3	= μg RNS/ml
DNS: E_{260} . 49,4	= μg DNS/ml

Die so erhaltenen Anhaltswerte dienten nur zur groben Abschätzung der Nucleinsäuremengen. Quantitativ exakte UV-spektrometrische Bestimmungen von Nucleinsäuren können nur nach Hydrolyse durchgeführt werden.

2.7.6. Bestimmung der Extinktionsänderung von Nucleinsäuren durch thermische Denaturierung (Schmelzkurven).

Die Hyperchromasie der einzelnen DNS- und Chromatinfractionen bei steigender Temperatur wurde im registrierenden UV-Photometer (ZEISS) bei einer Wellenlänge von 260 nm beobachtet. Die zu untersuchenden Proben wurden in Tris-Puffer 0,01 M pH 8.0 bzw. in Tris-Puffer 0,01 M pH 8.0 + EDTA 0,001 M aufgenommen und sowohl in Vergleichs- als auch Meßküvette (2 cm QS) überführt. Nur die Meßküvette wurde kontinuierlich um 1° C in 1 Minute von Zimmertemperatur auf 95° C erhitzt. Zu diesem Zweck wurde ein temperierbarer Küvettenhalter im Durchfluß mit Wasser aus dem Thermostaten erhitzt, der die Wärme auf die Küvette und die zu untersuchende Lösung übertrug. Die Extinktionszunahme wurde kontinuierlich geschrieben und die jeweilige Temperatur alle 5° C vermerkt. Zur Temperatureichung wurde im Bereich zwischen 20 und 100° C die reale Temperatur in der Küvette gemessen und mit der am Thermostaten angezeigten Temperatur verglichen. Die jeweilige Differenz wurde bei der Auswertung der Schmelzkurven berücksichtigt.

2.7.7. Basenanalyse

Die Basenzusammensetzung der cRNS-Fraktion wurde nach alkalischer Hydrolyse (0,5 N KOH Endkonzentration; Inkubationszeit 16 h bei 35° C) mittels Säulenchromatographie über DOWEX 50 WX 4, - 400 mesh nach BLATTNER und ERICKSON (1967) bestimmt. Dihydrouracil wurde analog der von MAGRATH und SHAW (1967) angegebenen Methode nach Umwandlung in β -Alanin durch Alkali-Behandlung mit Hilfe des Mikroamino-säureanalysators CHROMATOCORD der Fa. LABOTRON, München, erfaßt. β -Alanin erscheint als scharfer symmetrischer Peak nach Tyrosin und Phenylalanin. Zur Berechnung der Dihydrouracilgehalte wurde die von MAGRATH und SHAW angegebene und in eigenen Versuchen bestätigte 70 %ige Umwandlung von Dihydrouracil in β -Alanin zugrunde gelegt.

2.7.8. Dichtegradienten-Zentrifugation

2.7.8.1. Saccharose-Gradientenzentrifugation

Verschiedene analytische bzw. präparative Arbeitsgänge der vorliegenden Arbeit schlossen eine Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation ein, die hier allgemein beschrieben wird und je nach Anforderung, wie jeweils vermerkt, geringfügig modifiziert wurde.

Die Saccharoselösungen zwei verschiedener Konzentrationen wurden mit dem jeweils vorgeschriebenen Lösungsmittel angesetzt. Um eventuell vorhandene Ribonucleasespuren zu entfernen, wurden die Saccharoselösungen mit Bentonit (1 µg/ml) versetzt und 20 Minuten lang geschüttelt. Zur Entfernung des Bentonits wurde die Mischung in einer Ultrazentrifuge 30 Minuten bei 45.000 x g zentrifugiert. Die mit dem von GEIBEL (1971) beschriebenen Gradientenmischer hergestellten linearen Saccharosegradienten (18 ml) wurden vorsichtig mit dem jeweiligen zu untersuchenden Material überschichtet und in einer Ultrazentrifuge MSE Superspeed 50 in einem Swing-out-Rotor (3 x 20 ml) zentrifugiert. Das Zentrifugenröhrchen wurde mit einem "tube piercer" der Fa. MSE angebohrt und der Inhalt mittels einer rückstoßfreien Labotron-Stempelpumpe nach oben herausgedrückt. Als Verdrängungsmittel diente das spezifisch außerordentlich schwere Trichloräthylen bzw. gesättigte Saccharoselösung. Die Registrierung der Gradienten erfolgte durch kontinuierliche Messung der UV-Absorption bei der jeweils erforderlichen Wellenlänge im Spektralphotometer PMQ II (ZEISS) mit 1 cm Mikrodurchflußküvette. Kontinuierlich wurde die Extinktion mit einem 10"-Schreiber der Fa. BECKMAN geschrieben. Falls erforderlich, wurde der Gradient fraktioniert, mit einem LKB-Fraktionssammler gesammelt und von jeder Fraktion ein UV-Absorptionsspektrum (220 - 320 nm) geschrieben.

Alkalischer Saccharose-Dichtegradient

Zur Abschätzung der DNS-Molekülgröße der einzelnen Präparationsfraktionen wurde das Sedimentationsverhalten in einem alkalischen Saccharose-Dichtegradienten beobachtet. Im wesentlichen wurde verfahren wie oben angegeben. Der lineare Gradient wurde in einer Konzentration von 5 - 30 % (w/w) Saccharose unter Zusatz von 0,1 N NaOH, 0,9 N NaCl und 1,0 mM EDTA hergestellt (SEIFART et al., 1973). Er wurde überschichtet mit 0,5 - 3 ml Chromatinlösung bzw. Überstand nach Karyolyse und Tris-Waschung und 18 Stunden lang im Swing-out-Rotor bei 25.000 upm = 75.000 x g zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurden die Gradienten nach oben herausgedrückt und die Extinktion bei 260 nm geschrieben.

2.7.8.2. Caesiumchlorid-Gleichgewichtszentrifugation

Die Trennung von Protein und DNS durch isopyknische Zentrifugation wurde mit Caesiumchlorid-Gradienten durchgeführt. CsCl wurde dazu in 0,1 M Tris-Puffer pH 8,0 gelöst. Konzentration und Zentrifugendaten sind bei den jeweiligen experimentellen Kapiteln angegeben.

2.7.9. Polyacrylamid-Gelelektrophorese / MAK-Chromatographie

Zur Beurteilung der bei der Chromatinpräparation erhaltenen nicht sedimentierenden Überstandsfractionen und der verschiedenen chromosomalen RNS-Fractionen wurden vereinzelt Analysen mit Hilfe der Polyacrylamid-Gelelektrophorese und der Säulen-Chromatographie über Methylalbuminkieselgur durchgeführt.

Die Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurde nach der Vorschrift von LOENING (1967) in einer Apparatur der Fa. SHANDON,

London, unter Verwendung von 5 %igen Gelen durchgeführt. Zur Auswertung wurden die ungefärbten Gelzylinder in eine Quarztrogküvette von 10 cm Länge gelegt und Lage und Intensität der Nucleinsäurebanden bei 260 nm mit Hilfe eines Zusatzgerätes für die disc-Elektrophorese zum Photometer PMQ II (ZEISS) ermittelt.

Die Chromatographie über Methylalbuminkieselgur wurde mit den o.a. Fraktionen nach MANDELL et al. (1960) durchgeführt.

2.7.10. Isotopenanalysen

Die Isotopenmessungen wurden im Flüssigkeitsscintillationszähler MARK I der Firma NUCLEAR, Chicago, durchgeführt. Für die Aktivitätsbestimmungen nach der Papierplättchenmethode wurde ein Toluol/PPO/POPOP-System eingesetzt. (5,0 g PPO, 0,1 g POPOP, Toluol ad 1 l). Für vereinzelt durchgeführte wässrige Proben wurde der von BRAY (1960) angegebene Dioxan-Scintillator verwendet, der wie folgt zusammengesetzt war:

PPO	4,0 g
POPOP	0,2 g
Naphthalin	60,0 g
Methanol	100,0 ml
Aethylenglycol	20,0 ml
Dioxan ad	1000,0 ml

Die Proben wurden mit einer für ^{14}C in Toluolscintillator optimierten Einstellung von 97 % Ausbeute gemessen:

	Atenuatoreinstellung	Discriminator L-U
^3H -Kanal A	A 9.20	0.5 - 9.9
^{14}C -Kanal B	E 4.0	0.5 - 9.9
^{131}Ba -Kanal C	D 9.0	0.5 - 9.9

Bei wässrigen Proben wurde die absolute Aktivität mit Hilfe des externen ^{131}Ba -Standards nach der Kanalverhältnismethode errechnet.

3. EXPERIMENTELLE ERGEBNISSE

3.1. Analytische Daten von Leber-Chromatin

3.1.1. Vergleich der Chromatinausbeute bei Anwendung verschiedener Präparationsverfahren

Chromatin ist ein Nucleohiston, das neben einer geringen Menge RNS die mit Säure extrahierbaren Proteine (Histone) sowie eine Restproteinfraktion ("residual proteins" oder Nichthistonproteine) enthält. In Abhängigkeit vom Differenzierungsgrad und dem Funktionszustand einer Zelle sind Zusammensetzung, Struktur und Konsistenz des Chromatins uneinheitlich. Nachgewiesen ist das Vorliegen einer kondensierten, wahrscheinlich genetisch inaktiven Form, des sogenannten Heterochromatins und einer aufgelockerten, zur Transcription befähigten Form, die mit Euchromatin bezeichnet wird. Das letztgenannte funktionsfähige Chromatin kann sich in vivo in einem metabolisch aktiven oder zeitweise inaktiven Zustand befinden; Aktivierung und Repression resultieren nach den zur Zeit wahrscheinlichen Konzepten aus der Anlagerung von Steuerungsfaktoren mit Protein- oder Nucleinsäurecharakter an die DNS-Matrize. Um Aussagen über Funktionszustand und Eigenschaften des genetischen Zellmaterials in vivo machen zu können, ist es notwendig, das Chromatin weitgehend quantitativ und in dem nativ vorliegenden Status zu präparieren. Die Aussicht, das weite Spektrum strukturell und funktionell unterschiedlicher Chromatinanteile unverändert zu gewinnen, ist umso größer, je vollständiger die Ausbeute und je schonender das Präparationsverfahren ist. Diese beiden Erfordernisse sind wegen der gegensätzlichen methodischen Konsequenzen gleichzeitig nicht voll zu verwirklichen. Um möglichst optimale Bedingungen zu schaffen, haben wir die Brauchbarkeit der wesentlichen in der Literatur angegebenen Präparationsverfahren für unsere experimentellen Zwecke geprüft. Als Vergleichskriterien wurden die

CHROMATIN-PRÄPARATION

nach
A HUANG/DAHMS B MAYFIELD und BONNER

Fraktion	DNS mg/g Leber	DNS % des Ges.- Gehal- tes	RNS mg/g Leber	RNS % des Ges.- Gehal- tes	Protein mg/g Leber	DNS mg/g Leber	DNS % des Ges.- Gehal- tes	RNS mg/g Leber	RNS % des Ges.- Gehal- tes	Protein mg/g Leber
Überstände der Kernreinigung										
Übst.d.Fraktion in Puffer A	A 1									
(Sacchar./Tris)	B									
Übst.d.Triton- Reinigung	A 2									
Übst. d. Kern- waschung in Puffer A										
1. Übst.nach Karyolyse	LYS 1	0,263	10,9	4,082						
2. Übst.nach Karyolyse	LYS 2	1,112	46,2	1,422						
Übst.d.Chroma- tin-Waschg.mit 0,01 N Tris- Puffer pH 8.0 1 - 3	TRIS 1 TRIS 2 TRIS 3	0,722	30,0	0,347						
Summe der Überstände		2,097	87,1	5,851						
ROHCHROMATIN		0,311	12,9	0,178						
GER.CHROMATIN		0,019	0,79	0,024						
Ges.-Chromatin- Geh. d. Leber+		2,408	100,0	6,029						

Tabelle 1: Vergleichende Darstellung der nach HUANG/DAHMS bzw. MAYFIELD und BONNER präparierten Leber-
chromatine. Angabe von Ausbeute und Präparationsverlust für 1 g Leber.

CHROMATIN-PRÄPARATION NACH HUANG/DAHMS UND MAYFIELD UND BONNER

Chromatin-Zusammensetzung

(bezogen auf DNS = 1)

HUANG/DAHNIUS			MAYFIELD UND BONNER				
	DNS	RNS	Protein		DNS	RNS	Protein
ROHCHROMATIN	1	0,57	13,53		1	0,08	0,83
GER.CHROMATIN	1	1,27	16,46		1	0,10	0,91

Tabelle 1 a:

Vergleichende Darstellung der nach HUANG/DAHMS bzw. MAYFIELD und BONNER präparierten Leberchromatine.
Einsatz: 9,36 g Leber (DAHMS) bzw. 9,49 g Leber (BONNER)

Chromatinausbeute (prozentualer DNS-Gehalt bezogen auf Gesamt-DNS), Chromatinzusammensetzung (DNS-RNS-Protein-Relation) und Matrizenaktivität (^{14}C -UTP-Einbau) bestimmt.

Tabelle 1 stellt im Vergleich die DNS-Ausbeute der Präparation nach HUANG/DAHMUS (1969) und nach MAYFIELD und BONNER (1971) dar. Evident wird der Unterschied beider Präparationsmethoden bei der Betrachtung der prozentualen DNS-Ausbeute im Rohchromatin. Während bei der Präparation nach HUANG/DAHMUS nur 13 % der in der Leber vorhandenen DNS im Rohchromatin zurückblieben, war es möglich, durchschnittlich 64 % (in einzelnen Versuchen sogar bis zu 95,6 %) der gesamten DNS bei Anwendung der modifizierten Vorschrift nach MAYFIELD und BONNER zu sedimentieren. Bei der Präparation nach HUANG/DAHMUS wird von unfraktioniertem Ganzgewebe ausgegangen. Bereits der erste Schritt, die Plasmolyse des Ganzgewebes brachte einen DNS-Verlust von 57 %. Bei den folgenden drei Waschungen mit Tris-Puffer gingen weitere 30 % DNS verloren, so daß das Rohchromatin nur noch 13 % der Ausgangs-DNS enthielt. Bei der modifizierten Methode nach MAYFIELD und BONNER werden zuerst Zellkerne isoliert und mit Hilfe des Detergens Triton X 100 von der äußeren Kernmembran und dem endoplasmatischen Netzwerk befreit. Der DNS-Verlust bei dieser Methode der Kernfraktionierung war mit 12 % vergleichsweise gering; die nachfolgenden Schritte der Karyolyse und Tris-Waschungen brachten hier im auffallenden Unterschied zur HUANG/DAHMUS-Methode ebenfalls einen nur geringen DNS-Verlust (23 %).

Vergleichsweise wurde Chromatin aus Rattenlebern, dem von MAYFIELD und BONNER angegebenen Ausgangsgewebe zur Chromatinbereitung, präpariert. Auch hier lag die Ausbeute mit 52,5 % DNS im Bereich der für Mäuseleber gefundenen Werte.

Eine weitere Anforderung an isoliertes Chromatin, die erfüllt werden sollte, ist ein hoher Reinheitsgrad, d.h. ein möglichst geringer Anteil an unspezifischen, nicht der Chromatinregulation dienenden Nucleinsäuren und Begleitproteinen.

Tabelle 1 zeigt, daß das Verfahren nach MAYFIELD und BONNER der Vergleichsmethode auch hierin deutlich überlegen war. Eine grobe Reinigung z.B. von Bindegewebsfasern wird bei beiden Verfahren durch die Filtration durch Mull erreicht. Vom Überwiegenden Protein- und RNS-Anteil wird das Chromatin während der einzelnen Reinigungsschritte der jeweiligen Chromatinpräparation in unterschiedlichem Ausmaß befreit. Rohchromatin nach HUANG/DAHMUS enthält noch 3 % der gesamten Zell-RNS, das nach MAYFIELD und BONNER präparierte Rohchromatin nur 1,6 %. Der Proteingehalt von Rohchromatin nach HUANG/DAHMUS war um das Vierfache höher als der des Rohchromatins nach MAYFIELD und BONNER.

Zur weiteren Reinigung wurden die Rohchromatine der beiden Präparationsarten jeweils einer Saccharose-Gradientenzentrifugation unterworfen. Hinsichtlich der Chromatinausbeute wurden die Ergebnisse dadurch verschlechtert, daß nicht nur RNS und Protein, sondern auch beträchtliche Mengen an DNS im Saccharose-Überstand verblieben (Tab. 1 und 1a).

Bei der Methode nach HUANG/DAHMUS sank der DNS-Gehalt im gereinigten Chromatin schließlich auf 0,8 %, bei der Methode nach MAYFIELD und BONNER auf etwa 50 % ab.

Trotz dieses starken Verlustes war bei der Methode nach HUANG/DAHMUS eine Saccharose-Gradientenzentrifugation unabdinglich, da das Rohchromatin wegen des teilweise vollkommenen Fehlens bzw. der nur geringen ^{14}C -UTP-Matrizenaktivität im ungereinigten Zustand für unsere Versuche nicht zu verwenden war.

Rohchromatin nach MAYFIELD und BONNER zeigte bereits im ungereinigten Zustand eine ausreichende Matrizenaktivität, die durch Saccharose-Gradientenzentrifugation meist nicht mehr erheblich gesteigert werden konnte. Da auch die Reinheit der Präparation vergleichsweise nicht verbessert werden konnte, weil der Verlust an DNS größer war als der an RNS und Protein, wurde in allen weiteren Präparationen nach MAYFIELD und BONNER auf eine Saccharose-Gradientenzentrifugation verzichtet.

3.1.2. Zusammensetzung von Chromatin nach MAYFIELD und BONNER

Aus dem Vergleich der analytischen Daten der beiden oben erwähnten Präparationsarten geht deutlich hervor, daß für unsere Zwecke die Chromatinpräparation nach MAYFIELD und BONNER wegen der höheren Ausbeute an DNS und der größeren Reinheit wesentlich günstigeres Ausgangsmaterial lieferte als die nach HUANG/DAHMUS. Sie wurde deshalb bei allen weiteren Präparationen angewendet.

	mg DNS/ g F.G.
Gesamt-DNS-Gehalt pro g Leber	1,925 ± 0,31
DNS-Gehalt des Chromatins pro g Leber	1,209 ± 0,35
Gehalt an nicht-sedimentierter DNS der Überstände	0,716
<u>Chromatin-Ausbeute</u>	%
(prozentualer Anteil der Chroma- tinpräparation, bezogen auf die gesamte Leber-DNS)	62,8
<u>Chromatin-Gehalt</u>	mg / g F.G.
RNS	0,140 ± 0,04
Gesamt-Protein ⁺	1,875 ± 0,59
Nichthiston-Protein	0,886 ± 0,41
Histon-Protein	1,171 ± 0,41
<u>Chromatin-Zusammensetzung</u>	
(bezogen auf DNS = 1)	
DNS	1
RNS	0,12
Protein	1,56
Nichthiston-Protein	0,74
Histon-Protein	0,97
=====	

Tabelle 2: Zusammensetzung von nach MAYFIELD und BONNER präpariertem Leber-Chromatin (Rohchromatin)
Mittelwert von 168 unbehandelten NMRI-Mäusen.

+) Gesamt-Proteingehalte sowie Histon- und Nichthistonprotein wurde in getrennten Analyseegängen bestimmt.

In Tabelle 2 sind die mit dieser Methode bei 168 unbehandelten NMRI-Mäusen gefundenen Durchschnittswerte von Chromatinsgehalten, -ausbeute und -zusammensetzung dargestellt. Neben RNS und Gesamt-Protein wurde auch der Gehalt an Nicht-histon- und Histon-Protein bestimmt. Aufgrund seiner unterschiedlichen Löslichkeitseigenschaften wurde das Protein nach der in Kap. 2.7.4. angegebenen Vorschrift in die beiden Komponenten getrennt; die basischen Histone lassen sich infolge ihrer salzartigen Bindung an DNS mit schwachen Säuren extrahieren, wobei eine Restprotein-Fraktion ("residual proteins" oder Nicht-histon-Protein) gebunden an DNS, zurückbleibt. DNS-Gehalt und Chromatinsausbeute des Gesamtkollektivs entsprechen in etwa den Werten des Einzelversuchs, der Tab. 1 und Tab. 1a zugrunde liegt. Die Chromatin-Zusammensetzung, als Verhältnis der einzelnen Chromatin-Komponenten zueinander angegeben, bezogen auf DNS = 1, lag bei allen Einzelversuchen innerhalb eines vergleichsweise engen Variationsbereichs.

Die Protein-DNS-Relation entsprach zufriedenstellend den in der Literatur für Leberchromatin anderer Tierarten mitgeteilten Werte (DAHMUS und BONNER, 1970).

Auch die von uns sehr konstant gefundenen RNS-Gehalte in Roh- und gereinigtem Chromatin lagen in der von anderen Autoren angegebenen Größenordnung (DAHMUS und McCONNELL, 1969). Der auf 1 mg Chromatin-DNS entfallende RNS-Anteil von 0,12 mg entspricht etwa 1,5 % der gesamten Zell-RNS.

3.2. Bestimmung der Matrizen-Funktion des Chromatins im in-vitro-System

Neben den angeführten quantitativen analytischen Daten wurde sowohl für Chromatin als auch für die während der Präparation anfallenden Fraktionen die DNS-Matrizenaktivität bestimmt.

3.2.1. Charakterisierung der Transcriptionskinetik

Um quantitativ vergleichbare Werte zu erhalten, war es zunächst erforderlich, die für das beschriebene *in vitro*-RNS-Synthesystem optimalen Grundbedingungen zu ermitteln. Dazu war es notwendig, Transcriptionseigenschaften und -kinetik des Systems zu charakterisieren.

Abb. 5 und 6 zeigen Dosis-Wirkungskurven, aus denen die Abhängigkeit des ^{14}C -UTP-Einbaus bzw. der RNS-Synthese von der Quantität der DNS-Matrize hervorgeht. Auf der Abzisse wurden steigende Mengen DNS, jeweils bei gleichbleibender Menge der Reaktionspartner und gleichem Gesamtvolumen der Probe, auf der Ordinate die resultierenden cpm, als Maß für die Menge der synthetisierten RNS, aufgetragen.

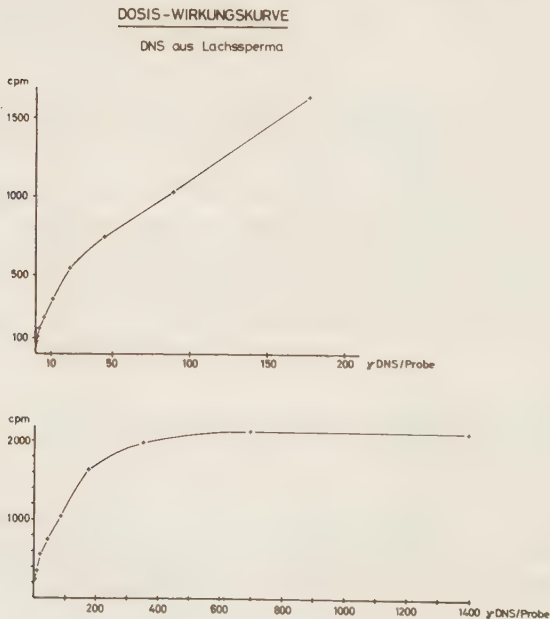


Abb. 5

Dosis - Wirkungskurve (Chromatin)

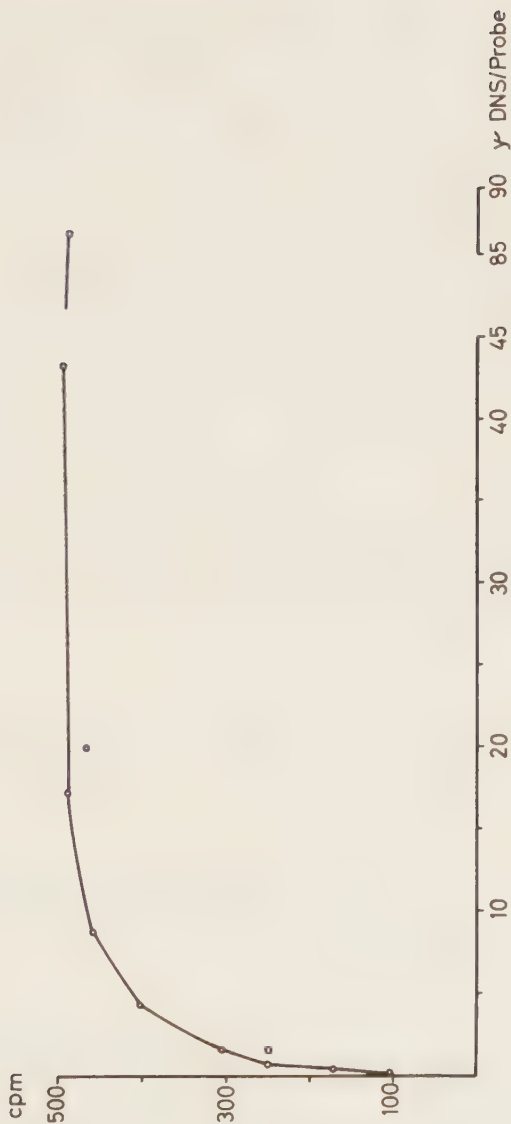


Abbildung 6

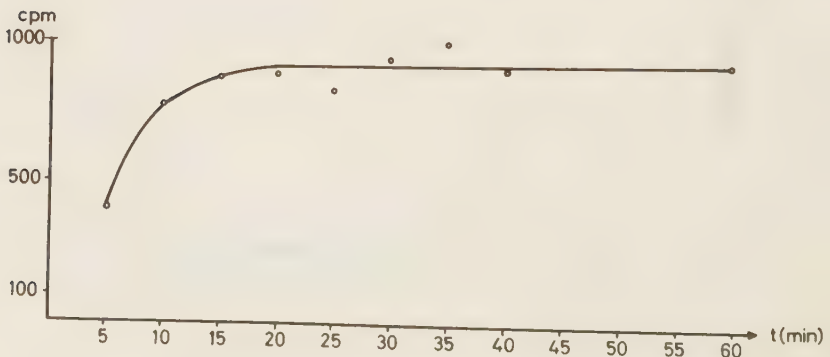
Die Versuche wurden sowohl mit DNS aus Lachssperma (Abb. 6) als auch mit nach MAYFIELD und BONNER präpariertem Chromatin ausgeführt. Wie aus Abb.5/6 hervorgeht, lag die Sättigungskonzentration bei der von uns verwendeten Lachssperma DNS bei 300 - 400 ug; sie lag bei der Austestung aller Enzympräparationen in diesem Bereich. Bei Chromatin wurde durchweg eine niedrigere Sättigungskonzentration gefunden; sie war bei den einzelnen Präparationen nicht absolut identisch, lag aber im Bereich zwischen 15 und 50 ug DNS/Ansatz. Da eine deutliche Abhängigkeit von der Aktivität des Enzyms bestand, mußte die Sättigungskinetik für jede Polymerase-Präparation neu bestimmt werden.

Um Unterschiede in der DNS-Matrizenaktivität zu erfassen, schien es nach diesen Befunden sinnvoll, generell innerhalb des Konzentrationsbereichs bis zu 20 ug DNS pro Probeansatz zu bleiben.

Weiterhin mußte der zeitliche Verlauf der RNS-Synthese in vitro untersucht werden. Zu diesem Zweck wurde einem Inkubationsansatz alle 5 Minuten je eine Probe entnommen und deren ^{14}C -UTP-Einbaureate bestimmt.

Abbildung 7

Einbaureate (cpm) in Abhängigkeit von der Inkubationzeit des Testansatzes



In Abb. 7 wurden die cpm bei fortlaufend steigender Inkubationszeit aufgetragen. Aus der daraus resultierenden Kurve geht hervor, daß das Maximum der in vitro-RNS-Synthese analog den Befunden von MARUSHIGE und BONNER (1966) nach 20 Minuten erreicht ist und sich auch nach 60-minütiger Inkubation nicht verändert. In allen folgenden Versuchen wählten wir deshalb eine Inkubationszeit von 30 Minuten.

Um sicher zu sein, daß die Polymerase nicht als limitierender Faktor der RNS-Synthese wirkte, wurde die Enzymmenge bestimmt, die bei gleichbleibender Chromatinkonzentration für die maximale Einbaurrate erforderlich war.

Enzym - Wirkungskurve

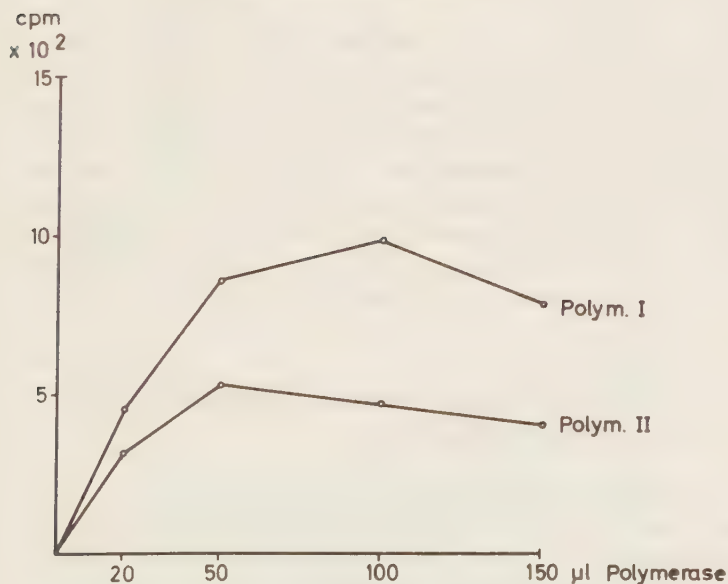


Abbildung 8

Die in Abb. 8 dargestellten Enzym-Wirkungskurven wurden bei Einsatz steigender Enzymmengen zweier Polymerasepräparationen mit verschiedener Aktivität erhalten. Sie zeigen, daß die optimale Enzymmenge bei verschiedenen Präparationen unterschiedlich war. Bei beiden Polymerasechargen zeigte sich die gleiche Verlaufscharakteristik. Im Bereich niedriger, noch reaktionslimitierender Enzymkonzentrationen stieg die Einbaurrate mit der Erhöhung der Enzymmenge an, nach Erreichen der für die Sättigung des im Ansatz vorhandenen Chromatins erforderlichen Enzymmenge blieb die Einbaurrate bei weiterer Enzymzugabe zunächst gleich und fiel bei weiterer Erhöhung der Enzymkonzentration langsam ab. Die Ursache des Absinkens dürfte in der hohen Proteinkonzentration der Testansätze zu suchen sein, denn eine analoge Erniedrigung der Matrizenaktivität ließ sich auch durch Zugabe gleicher Konzentrationen von Nichtenzymprotein erreichen.

Um eine Limitierung der RNS-Synthese durch eine zu geringe oder zu hohe Enzymmenge auszuschließen, mußten Mengen eingesetzt werden, die im Bereich des Aktivitätsplateaus vor dem Absinken der Aktivitätskurve lagen. In allen Versuchen wurde deshalb bei Verwendung von Polymerase I 100 µl und bei Polymerase II 50 µl Enzym zum Inkubationsansatz zugegeben. Wegen der unterschiedlichen Aktivität des Enzyms verschiedener Präparationen wurde bei jeder neuen Polymerase-Präparation eine Enzym-Wirkungskurve aufgestellt.

3.2.2. Matrizenaktivität der Chromatine nach HUANG/DAHMUS und MAYFIELD und BONNER

Die nach verschiedenen Präparationsmethoden gewonnenen Chromatine, deren analytische Daten bereits beschrieben wurden, untersuchten wir unter den ermittelten optimalen Bedingungen auf ihre Matrizenaktivität. Die Ergebnisse sind in einer vergleichenden Tabelle zusammengestellt (Tab. 3).

Chromatin- Präp.	Zahl der Tiere n	Spezif. ^{14}C -UTP- Einbauaktivität cpm/mg DNS	^{14}C -UTP-Einbau- aktivität des Sediment.Chroma- tins von 1 g Leber cpm/g F.G.	^{14}C -UTP-Einbau- aktivität des Ges.-Chromatins von 1 g Leber cpm/g F.G.
Rohchromatin (Huang/Dahmus)	10	31.016	11.120	75.729
gerein.Chromatin (Huang/Dahmus)	5	137.765	21.162	739.738
Rohchromatin (Mayfield u.Bonner)	171	37.256	38.703	64.872
gerein.Chromatin (Mayfield u.Bonner)	15	84.141	49.551	1.006.553

Tabelle 3: Matrizenaktivität verschiedener Chromatinpräparationen.
Mittelwerte von 201 unbehandelten NMRI-Mäusen.

Um vergleichbare Größen zu erhalten, wurden die bei den einzelnen Ansätzen ermittelten cpm auf 1 mg DNS bezogen. Die dadurch errechnete "spezifische Einbauaktivität" der einzelnen Chromatine zeigte die schon erwähnten Unterschiede zwischen Roh- und gereinigtem Chromatin der einzelnen Präparationen. Da bei der Fragestellung dieser Arbeit neben der spezifischen Einbauaktivität vor allem auch die Syntheseaktivität des Gesamtchromatins der Leber in vivo interessierte, wurde außerdem die ^{14}C -UTP-Einbauaktivität für das sedimentierte Chromatin von 1 g Leber errechnet. Wegen der erwähnten unterschiedlichen Ausbeute der verschiedenen Präparationsverfahren und vor allem auch wegen der vom Funktionszustand der Leber abhängigen Differenzen bei zu vergleichenden Tiergruppen besitzt die Angabe der Einbaurates des sedimentierten Chromatins von 1 g Leber nur relativen Wert. Unter Berücksichtigung des Präparationsverlustes wurde deshalb außerdem die RNS-Syntheseaktivität für das Gesamtchromatin von 1 g Leber errechnet. Als Grundvoraussetzung hierfür wurde angenommen, daß die nicht sedimentierenden Chromatinanteile gleiche ^{14}C -UTP-Einbauaktivität wie sedimentiertes Chromatin besitzen. Zur Überprüfung dieser Prämisse wurde die Matrizenaktivität aller während der Präparation anfallender Überstände untersucht.

3.3. Untersuchung der Eigenschaften nicht sedimentierender Chromatinanteile

3.3.1. Matrizenaktivität

Wie aus Tab. 1 hervorgeht, ließen sich erhebliche und quantitativ unterschiedliche Chromatinmengen unter den angegebenen experimentellen Bedingungen nicht als Rohchromatin sedimentieren. Um ein Bild von den Chromatineigenschaften der Gesamtleber zu erhalten, war es deshalb notwendig, die Fraktionen des Überstandes näher zu charakterisieren. Es

war zu entscheiden, ob es sich dabei um Chromatinbruchstücke mit den gleichen Matrizeneigenschaften, wie sie die sedimentierten Anteile besitzen, im Gewebe präformierte, besonders funktionsaktive Chromatinformen oder lediglich um während der Präparation durch Nucleasen degradierte inaktive Abbauprodukte handelt. Zur Klärung dieser Frage mußten die einzelnen Überstandsfractionen auf ihre Matrizenaktivität untersucht werden. Die Ergebnisse sind in Tab. 4 wiedergegeben. Da das bei der DNS-Bestimmung nach BURTON positiv reagierende Material der drei Überstände der Kernfraktionierung vor Karyolyse keine ^{14}C -UTP-Einbauaktivität zeigte, dürfte es sich hierbei um Desoxynucleotide oder Oligonucleotide handeln. Die nach Karyolyse im Überstand verbleibenden DNS-Anteile zeigten dagegen eine außerordentlich ausgeprägte Matrizenaktivität. Ihre spezifische ^{14}C -UTP-Einbaurrate übertraf die des sedimentierten Chromatins um ein Vielfaches.

Es war von wesentlicher Bedeutung, den Grund für diese im Vergleich zum Rohchromatin erheblich gesteigerte Matrizenaktivität der Überstände zu analysieren. Deshalb versuchten wir zuerst zu klären, ob die erhöhte ^{14}C -UTP-Einbaurrate eine reale, durch eine größere Effektivität der DNS-Matrize bedingte Wirkung darstellt, oder auf einem bei der Aufnahme der Dosis-Wirkungskurve einmalig beobachteten Verdünnungseffekt beruht: Bei sehr niedrigen Chromatinkonzentrationen ($< 10 \mu\text{g DNS/Probe}$) wurde dabei ein Anstieg der Matrizenaktivität gefunden. Zur Beantwortung dieser Frage wurden die verdünnten Überstandschromatine auf die beim sedimentierten Chromatin verwendeten Konzentrationen eingeeengt.

3.3.1.1. Ultrazentrifugation und Ultrafiltration von Überständen

Die Überstände der Karyolyse und der Tris-Waschungen wurden mittels 17-stündiger Ultrazentrifugation¹⁾ bei $100.000 \times g$ (av)

1) Auch mittels Ultrazentrifugation konnte das DNS-haltige Material nicht vollständig sedimentiert werden.

F r a k t i o n		Gehalt an nicht-sediment. DNS von 1 g Leber mg DNS/g F.G.	Spezif. ^{14}C -UTP-Einbaaktivität nicht-sediment.DNS cpm/mg DNS	^{14}C -UTP-Einbaaktivität der nicht-sediment. DNS von 1g Leber cpm/g F.G.
<u>Überstände der Kernreinigung</u>	A 1	0,131	0	0
	Übst.d.Fraktion in Puffer A (Sacchar./Tris)			
	Übst.d.Triton-Reinigung	0,097	0	0
	Übst. d. Kern- waschung in Puffer A	0,070	0	0
1. Übst. nach Karyolyse 2. Übst. nach Karyolyse	LYS 1	0,112	529.376	59.290
	LYS 2	0,262	220.096	57.665
Übst.d.Chromatin- waschung mit 0,01 M Tris- Puffer pH 8.0 1 - 3	TRIS 1	0,144	500.640	72.092
	TRIS 2	0,024	1.028.261	24.678
	TRIS 3	0,054	670.725	36.219

Tabelle 4: Matrizenaktivität der bei der Chromatinpräparation nicht sedimentierenden DNS.

und Ultrafiltration durch Filterhülsen SM 13200 der Fa. SARTORIUS, Göttingen, eingeengt und damit die DNS auf Konzentrationen, die denen des Rohchromatins entsprachen, konzentriert. Beim Testeinsatz dieser so konzentrierten Chromatine ergab sich folgendes Resultat: Der oben erwähnte Effekt der stark erhöhten Matrizenaktivität war nicht mehr zu verzeichnen; die spezifische ^{14}C -UTP-Einbauaktivität sank nach Anwendung beider Verfahren zur Konzentrierung des Chromatins annähernd in den Aktivitätsbereich des sedimentierten Chromatins ab.

Die Möglichkeit, daß die Verminderung der cpm meßtechnische Gründe hatte und auf verstärktem Quench oder einer teilweisen Absorption der weichen β -Strahlung durch die bei der Ultrazentrifugation und Ultrafiltration ebenso konzentrierten Proteine beruhte, konnte aus nachfolgenden Gründen ausgeschlossen werden.

Auch bei diesen proteinreichen Testansätzen bestand eine zufriedenstellende Linearität der cpm-Werte beim Fällen verschiedener Probevolumina auf den Plättchen. Zur weiteren Sicherung wurden die Plättchen aus den Meßgefäßen entfernt. Sie enthielten noch das radioaktive Material quantitativ, da die verbleibende Scintillationsflüssigkeit keine den Nullwert überschreitende Aktivität mehr besaß. Die Plättchen wurden, um die Scintillatorflüssigkeit vollständig zu entfernen, mit absolutem Aethanol gespült und die auf ihnen ausgefällte RNS anschließend in 2 ml 0,5 N NaOH 24 Stunden lang bei 30°C hydrolysiert. Das Hydrolysat wurde in Dioxan-Scintillator nach BRAY aufgenommen. Die gemessenen cpm des Hydrolysates lagen in der gleichen Größenordnung wie die entsprechenden gefällten Ausgangsproben, wodurch sich ein Absorptionseffekt radioaktiver Strahlung durch Proteine ausschließen ließ. Die Plättchen selbst enthielten nach der Hydrolyse keine Aktivität mehr; das markierte Material war demnach vollständig mit Alkali hydrolysierbar.

Die stark erhöhte Matrizenaktivität der Überstandsfractionen könnte außer auf dem schon erwähnten Effekt der Steigerung

der Einbauaktivität durch starke DNS-Verdünnung möglicherweise auch auf dem vermehrten Vorhandensein von Einstrang-DNS beruhen, die von Coli-Polymerase besser als Doppelstrang-DNS abgelesen wird. Der beobachtete Verlust an ^{14}C -UTP-Einbauaktivität nach Konzentrierung durch Ultrazentrifugation und Ultrafiltration wäre dann evtl. auf vermehrte Zusammenlagerung von Einstrang- zu Doppelstrang-DNS oder auf eine spezifische oder unspezifische Hemmung der Matrizenfunktion durch das mitkonzentrierte Protein zurückzuführen. Schließlich ist aber auch eine einfache Agglutination und Konglomeration des DNS enthaltenden Materials infolge der starken mechanischen Beanspruchung bei der oben beschriebenen Konzentrierung und ein damit verbundener Verlust an Matrizenaktivität denkbar.

3.3.1.2. Schmelzkurven

Zur weiteren Charakterisierung der nicht sedimentierbaren Chromatinanteile wurden deshalb Schmelzkurven der konzentrierten und nicht konzentrierten Überstandsfractionen sowie von Rohchromatin und Lachssperma-DNS angefertigt (vgl. Kap. 2.7.6).

Bei der thermischen Denaturierung von DNS bzw. Chromatin ändern sich infolge der Zerstörung der ursprünglichen Struktur die physikalischen Eigenschaften (Viskosität, Lichtabsorption und optische Drehung). Die Änderung der Lichtabsorption macht sich als "Hyperchromasie-Effekt" bemerkbar, bei dem die Endprodukte der Denaturierung eine höhere Lichtabsorption als das intakte Chromatin aufweisen.

Nach SHIH und LAKE (1972) lassen sich in nativem Chromatin die Anteile an freier, histongebundener und mit Nihthistonprotein assoziierter DNS aufgrund der Anstiegsmaxima ihrer Schmelzkurve abschätzen.

Abb. 9 zeigt die Schmelzprofile (Änderung der Lichtabsorption in Abhängigkeit von der Temperatur) von Chromatin (CHR), Überstand nach Karyolyse (LYS) und Waschflüssigkeit der Tris-Waschungen (TRIS). Dabei fällt auf, daß sich die drei

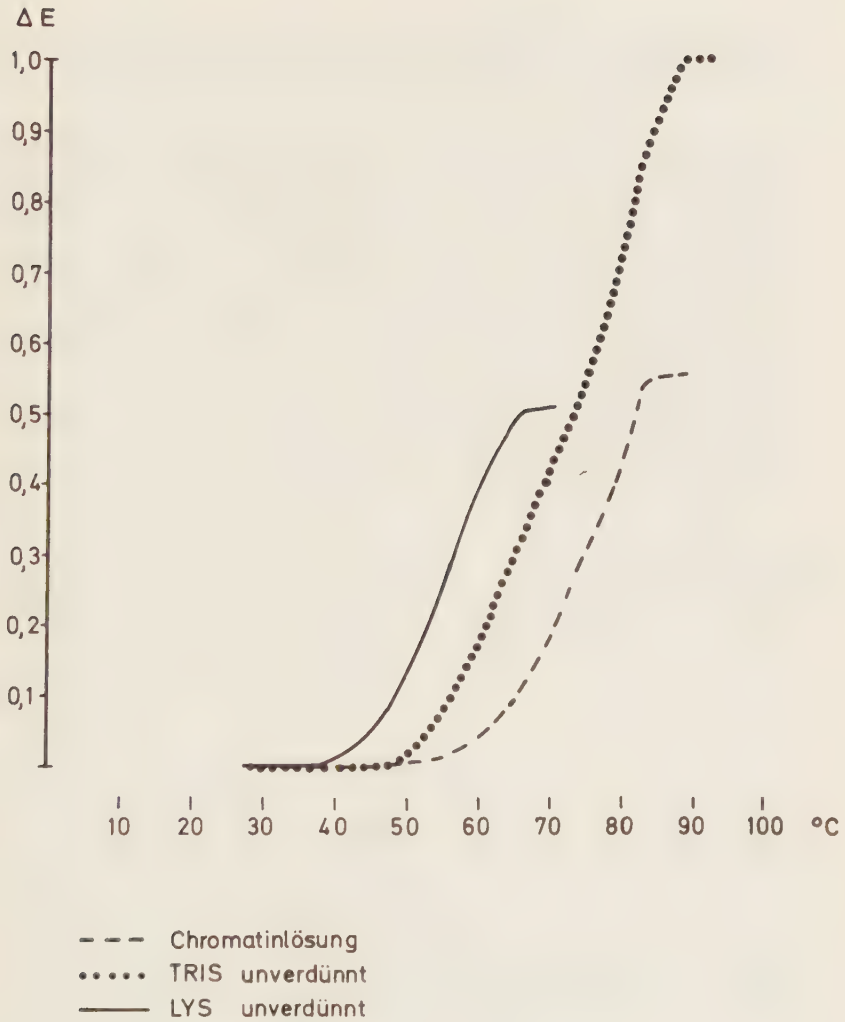


Abb. 9: Schmelzprofile der bei der Chromatinpräparation anfallenden DNS-haltigen Fraktionen
1. Chromatinlösung;
2. Überstand nach Karyolyse (LYS);
3. Waschflüssigkeit der Tris-Waschungen (TRIS).

Kurven in ihrem Schmelzverlauf ähneln, jedoch in ihrem Schmelzbeginn deutliche Unterschiede aufweisen.

Die Lösung sedimentierten Chromatins zeigte erst bei Temperaturen von 60°C eine beginnende Denaturierung, während die Chromatine der Überstände schon bei wesentlich niedrigeren Temperaturen zu schmelzen begannen. Sie zeigten damit das von SHIH und LAKE beschriebene Verhalten thermischer Denaturierung von freier DNS, die zwischen 40° und 50°C zu schmelzen beginnt, bei ca. 60°C ihr Extinktionsmaximum erreicht und dieses auch bei steigender Temperatur beibehält.

DNS aus Lachssperma, gelöst in 0,001 M Tris-Puffer, pH 8.0 + 0,01 M EDTA verhielt sich ebenso wie die von SHIH und LAKE beschriebene freie DNS (siehe Abb. 10).

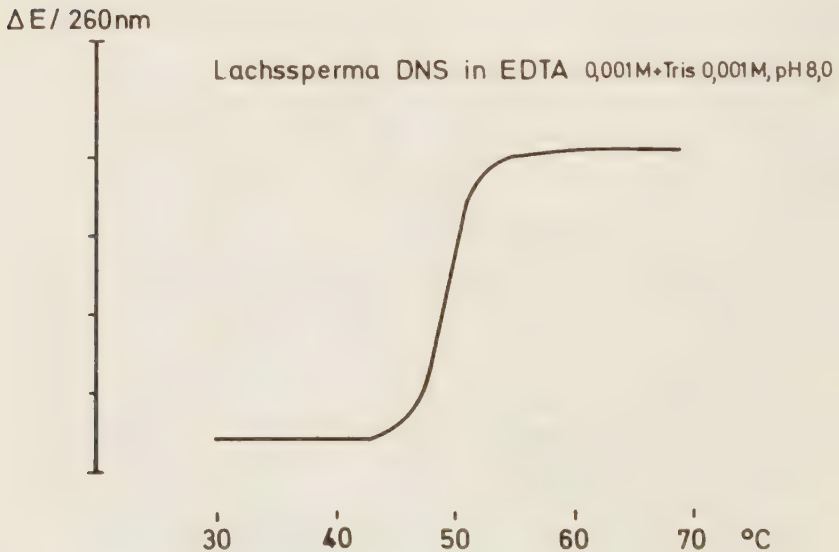


Abb. 10: Schmelzprofil von DNS aus Lachssperma, gelöst in 0,001 M EDTA und 0,001 M Tris, pH 8.0

Aus dem der freien DNS ähnlichen Schmelzverhalten ließ sich auf ein vermehrtes Vorhandensein proteinfreier DNS-Abschnitte in den Chromatinen der Überstände schließen.

Die in Kap. 3.3.1.1. erwähnten konzentrierten Überstandschromatine zeigten stark veränderte Schmelzprofile. Im Vergleich zu den nicht konzentrierten Überstandschromatinen wiesen sie eine Verschiebung zu höheren Schmelztemperaturen auf, ohne aber mit dem Profil des sedimentierten Chromatins identisch zu sein. Diese atypisch verlaufenden Schmelzkurven deuten eher darauf hin, daß durch die starke Beanspruchung bei der Konzentrierung durch Ultrazentrifugation und Ultrafiltration auf rein mechanischem Wege Konglomerate entstanden sind, die nicht auf molekularer Bindung beruhen. Eine Renaturierung der im biologischen Bereich vorkommenden Strukturen (Doppelhelix, H-Brücken, Supercoil) konnte durch die angewendeten Maßnahmen der Konzentrierung offensichtlich nicht erreicht werden. Möglicherweise ist auch der hohe Anteil an Proteinen und an deren hochmolekularen Verunreinigungen für den atypischen Verlauf der konzentrierten Überstandschromatine verantwortlich.

3.3.1.3. Alkalischer Saccharose-Gradient

Eine weitere Ursache der erhöhten Einbauaktivität der Überstandschromatine könnte auch ein erhöhter Anteil an DNS-Strängen geringerer Molekülgröße sein, die besser transkribiert werden als hochmolekulare DNS.

Zur Beurteilung dieser Frage wurde das Sedimentationsverhalten von sedimentiertem Chromatin und Überstandsfractionen in einem alkalischen Saccharose-Dichtegradienten ermittelt. Es besteht die Möglichkeit, DNS im denaturierten Stadium mittels eines alkalischen Saccharose-Dichtegradienten gemäß ihrem Molekulargewicht aufzutrennen (VAN DER SCHANS et al., 1969). Dabei werden die H-Brückenbindungen der Doppelhelix aufgelöst, so daß Einstrang-DNS vorliegt, die sich in Abhängigkeit von ihrer Kettenlänge (bzw. ihrer Sedimentationskoeffizienten) im Saccharose-Dichtegradienten verteilt.

Die Überstände der Karyolyse und der Tris-Waschungen sowie sedimentiertes Chromatin wurden vergleichend im linearen alkalischen Saccharose-Dichtegradienten (5 - 30 % w/w) aufgetrennt (vgl. Kap. 2.7.8.1).

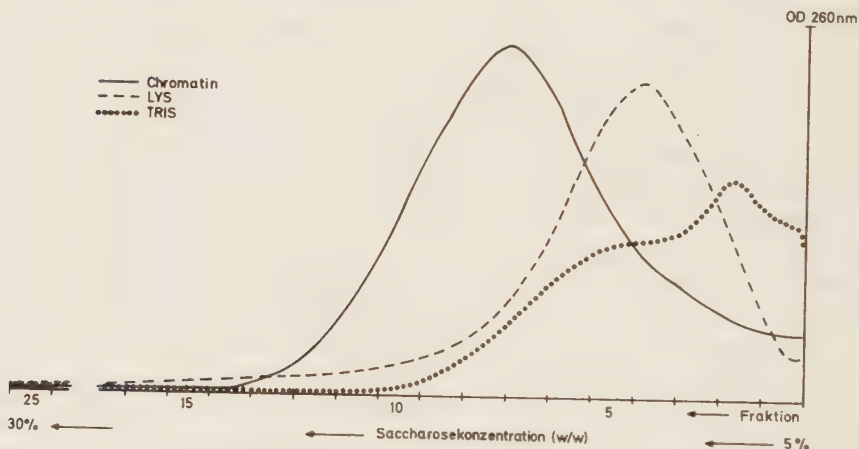


Abb. 11: Sedimentation DNS-haltiger Fraktionen im alkalischen Saccharose-Dichtegradienten.

Wie aus Abb. 11 hervorgeht, verteilte sich die DNS der drei Proben unter gleichen Bedingungen sehr unterschiedlich. Während die DNS des Chromatins am schnellsten sedimentierte, mit einem Maximum bei Fraktion 8 - 9, verblieb die des Überstandes nach Karyolyse im leichteren Gradientenbereich mit einem deutlichen Maximum bei Fraktion 4. Die DNS der Tris-Waschungen enthielt einen Anteil mit den Sedimentationseigenschaften der Karyolyse-DNS und einen großen Teil noch leichteren Materials, das an der Gradientenoberfläche verblieb. Im ganzen hob sich der Sedimentierungsbereich des Chromatins deutlich von dem der Überstände ab. Daraus geht eindeutig hervor, daß die Überstände wesentlich leichtere (im Saccharose-Dichtegradienten schwerer sedimentierbare) und im Vergleich zum Chromatin niedermolekulare DNS-Abschnitte enthalten.

Wie in jüngster Zeit nachgewiesen, wird in vivo DNS (in der S-Phase) zunächst in Form von mehreren kurzen Stücken synthetisiert, die dann mit Hilfe des Enzyms DNS-Ligase zu längeren DNS-Strängen verbunden werden, um dann die G2-Phase einzuleiten.

Die Maus besitzt einen ausgeprägten Circadianrhythmus mit einer S-Phase in den frühen Morgenstunden und einer Mitosephase zwischen 12.00 und 14.00 Uhr (SCHAUDE, 1973).

Bei einer Tötungszeit der Tiere im allgemeinen zwischen 8.00 und 10.00 Uhr wurde demnach Chromatin aus der späten S-Phase und der frühen G2-Phase untersucht. Es bestand deshalb die Möglichkeit, zu diesem Zeitpunkt noch nicht durch Ligase verbundene DNS-Anteile bei der Präparation erfaßt zu haben, die sich aufgrund ihres geringen Molekulargewichtes vermehrt in den Überständen befinden. Um diese Möglichkeit zu prüfen, präparierten wir auch Chromatin aus der frühen G1-Phase, (Tötungszeit der Tiere 16.00 Uhr) in der neusynthetisierte, niedermolekulare DNS nicht zu erwarten ist.

Bei diesen Präparationen war im Vergleich zu denen am frühen Morgen der quantitative Anteil an DNS in den Überständen mindestens gleich groß, z. T. eher noch erhöht.

Auch daraus ergibt sich die Wahrscheinlichkeit, daß es sich bei der Überstands-DNS um fertige funktionsfähige, evtl. um die in vivo aktiven DNS-Anteile handelt.

Zusammenfassend kann aus den Ergebnissen geschlossen werden, daß das Chromatin in den Überständen bezüglich des sterischen Aufbaus und der Matrizenaktivität sich von sedimentiertem Chromatin unterscheidet. Möglicherweise repräsentiert es die in vivo dereprimierten DNS-Abschnitte. Die stark erhöhte spezifische Transcriptionsaktivität dieser Fraktion kann bei zusammenfassender Wertung aller Analysen demnach als real angesehen werden.

3.4. Beeinflussung von Chromatingehalten und Chromatineigenschaften durch in-vivo-Applikation von Phenobarbital

Die unter Phenobarbital-Applikation beobachtete erhöhte Synthese von RNS und Proteinen in der Leber kann, wie einleitend erwähnt, prinzipiell auf einer Vermehrung des DNS-Gehalts oder auf einer Steigerung der Matrizenaktivität des vorhandenen Chromatins durch vermehrte Derepression oder möglicherweise auch auf beiden Prozessen beruhen. Es war deshalb von Bedeutung, sowohl die quantitativen Veränderungen der Chromatingehalte als auch eine durch qualitative Veränderung der Matrize hervorgerufene Steigerung der Aktivität zu erfassen.

3.4.1. Beeinflussung der Chromatingehalte

Konzentration

Die beim Gesamtkollektiv von je 125 Tieren gefundene Beeinflussung der Chromatingehalte durch Phenobarbital-Induktion gibt Tabelle 5 wieder. Die Ergebnisse zeigen unerwarteterweise, daß bei den mit Phenobarbital induzierten Lebern die bei der Präparation gewonnenen Chromatinmengen (= Ausbeute an Rohchromatin) deutlich unter denen der gleichzeitig mituntersuchten Kontrolltiere lagen. Diese Abnahme kann durch zwei Ursachen bedingt sein:

Einmal durch eine veränderte Relation von nicht sedimentierendem Überstandschromatin zu Rohchromatin. Da aus den im vorangegangenen Kapitel dargestellten Schmelzcharakteristika auf einen erhöhten Anteil an freien DNS-Abschnitten im Überstands-Chromatin zu schließen war, wäre es denkbar, daß nach Phenobarbitalinduktion vermehrt dereprimiertes und nicht sedimentierendes Chromatin vorliegt, das im Überstand verbleibt.

	K	Ph
Zahl der Tiere n	125	125
DNS-Gehalt des sedimentierten Chromatins mg/g F.G.	$1,271 \pm 0,52$	$1,147 \pm 0,30$
$\Delta\%$		- 9,8
DNS-Gehalt des Gesamtchromatins mg/g F.G.	$1,944 \pm 0,43$	$1,812 \pm 0,49$
$\Delta\%$		- 6,8
DNS-Gehalt der Gesamt-Leber mg/L 25	$2,653 \pm 0,40$	$2,950 \pm 0,50$
$\Delta\%$		+ 11,1

Tabelle 5: Beeinflussung des Chromatingehaltes durch Phenobarbital.
Induktionszeit 36 Stunden

Die daraufhin durchgeführten Analysen brachten eine eindeutige Bestätigung: In Abhängigkeit von der Induktionszeit war der DNS-Gehalt der Überstände von Phenobarbital-induzierten Lebern deutlich erhöht (Tab. 6). Trotzdem blieb bei der Berechnung der Summe aus Rohchromatin-DNS und Überstands-DNS die Konzentration des Gesamtchromatins pro g Leber im Vergleich zur Kontrolle annähernd unverändert oder teilweise geringfügig erniedrigt.

Gehalte der Gesamt-Leber

Die Abnahme der DNS-Konzentration in der induzierten Leber zeigt sich am deutlichsten in dem Zeitraum (30 bis 50 Stunden), in dem die Lebervergrößerung beginnt. In diesem Stadium übersteigt die Proteinzunahme die der Nucleinsäuren, und es kommt dadurch in der Gewebeseinheit zu einer relativen Abnahme des DNS-Anteils. Die realen Gehaltsveränderungen sind unter diesen Bedingungen der sich vergrößernden Leber nur aus dem DNS-Gehalt der Gesamtleber ersichtlich. Diese auf das Lebergewicht eines Standardtieres von 25 g bezogenen Werte sind in den letzten beiden Spalten der Tab.6 dargestellt; sie zeigen, daß im Verlauf der Induktion die DNS-Gehalte der Gesamtleber in den frühen Induktionsstadien annähernd unverändert sind und erst bei deutlich ausgeprägter Lebervergrößerung ansteigen.

3.4.2. Beeinflussung der Chromatinzusammensetzung und -struktur

Die Massenverhältnisse des sedimentierten Chromatins aus induzierter Leber zeigten während unterschiedlicher Induktionsphasen nur geringfügige und nicht signifikante Abweichungen vom sedimentierten Chromatin unbehandelter Tiere. Die RNS-, Gesamtprotein-, Nichthistonprotein- und Histonprotein-Gehalte sind in Tabelle 7, bezogen auf DNS = 1, zusammengestellt.

Induktions- zeit h	Zahl d. Tiere n	DNS-Gehalt des sedimentierten Chromatins mg/g F.G.	DNS-Gehalt d. Überstände mg/g F.G.	DNS-Gehalt d. Gesamt- Chromatins mg/g F.G.	Ausbeute %	DNS-Gehalt d. Gesamt- Leber ⁺ mg/L 25	Veränderung d. Chromatin- Gehaltes der Ges.-Leber ⁺ durch Ph. Appl. — %
K	15	1,341	0,553	1,894	70,8	2,560	
Ph 12-18	15	0,987	0,860	1,847	53,4	2,593	+ 1,3
K	15	1,144	0,657	1,801	63,5	2,407	
Ph 24	15	0,885	1,120	2,005	44,1	2,877	+ 19,5
K	38	1,139	0,710	1,849	61,6	2,320	
Ph 40-48	38	0,895	0,768	1,663	53,8	2,409	+ 3,8
K	15	1,341	0,553	1,894	70,8	2,560	
Ph 66-72	15	0,852	1,123	1,975	43,1	3,550	+ 38,7

Tabelle 6: Abhängigkeit der Chromatingehalte und Chromatinausbeute von der Induktionszeit mit Phenobarbital.

+ Die Gesamt-Leber wird generell für ein 25 g schweres Tier berechnet.

Induktions- zeit h		Zahl der Tiere n	DNS		RNS		Gesamt- Protein		Nichthiston- Protein		Histon- Protein	
K	-	167	1	:	0,12	:	1,71	:	0,74	:	0,97	
Ph	36	125	1	:	0,11	:	1,90	:	0,95	:	0,95	
Ph	12-18	15	1	:	0,10	:	1,46	:	0,67	:	0,79	
Ph	24	15	1	:	0,11	:	1,60	:	0,73	:	0,87	
Ph	40-48	38	1	:	0,12	:	1,96	:	0,91	:	1,05	
Ph	66-72	15	1	:	0,11	:	1,63	:	0,72	:	0,91	

Tabelle 7: Beeinflussung der Chromatin-Zusammensetzung durch Phenobarbital.

Auch die Schmelzkurven von Rohchromatin und Überstandsfraktionen Phenobarbital-induzierter Tiere zeigten die gleichen Grundcharakteristika wie die entsprechenden Kontrollpräparationen.

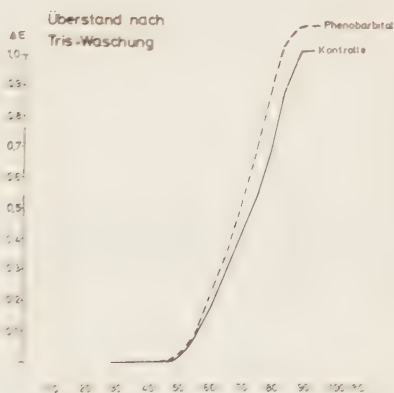
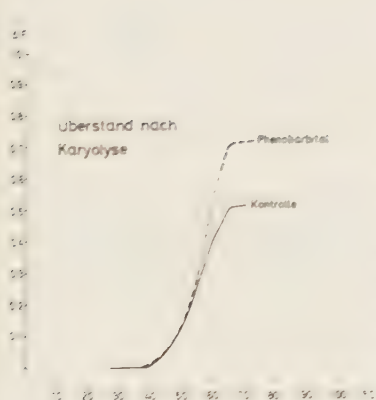
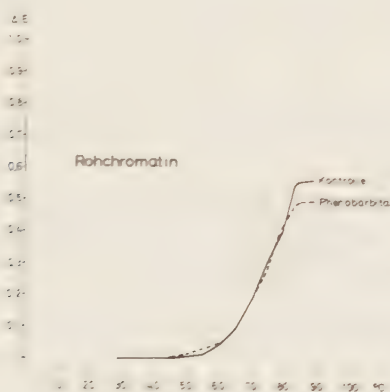


Abb. 12: Schmelzprofile von Rohchromatin und Überstandsfraktionen Phenobarbital-induzierter und unbehandelter Tiere.

Alle drei aus induzierten Lebern extrahierten Chromatin- bzw. Überstandsfraktionen zeigten jedoch eine geringe Verschiebung zu niedrigeren Schmelztemperaturen. Ob daraus entsprechend den in Kap. 3.3.1.2. für die verschiedenen DNS-Formen angegebenen Schmelzcharakteristika auf einen erhöhten Derepressionsgrad zu schließen ist, kann angesichts des geringen Ausmaßes nur durch statistische Analysen beurteilt werden.

Diese Interpretation stünde im Einklang mit den in der Literatur mitgeteilten Daten sowie mit allen experimentellen Ergebnissen dieser Arbeit.

3.4.3. Beeinflussung der Matrizenaktivität

Da in den vorangegangenen Gehaltsanalysen keine Chromatinzunahme gefunden wurde, die der außerordentlichen Steigerung der Matrizenaktivität durch Phenobarbitalapplikation entsprach, mußte zur Deutung eine Veränderung der spezifischen Aktivität der Matrize angenommen werden. Es war zunächst zu prüfen, ob sich das Chromatin Phenobarbital-induzierter Tiere bezüglich der Transcriptionskinetik analog dem unbehandelten Tiere verhielt. Nur unter dieser Voraussetzung konnte die Matrizenaktivität der verschiedenen Kollektive miteinander verglichen werden.

Eine Zeit-Wirkungskurve, die sowohl mit Kontroll- als auch mit Phenobarbital-Chromatin aufgenommen wurde, zeigt Abb. 13. Die Transcriptionskinetik des Phenobarbital-induzierten Chromatins war identisch mit der des Kontrollchromatins sowohl hinsichtlich des zeitlichen Verlaufs im ansteigenden Schenkel als auch im gleichbleibenden Maximum.

Auch die quantitativen Beziehungen zwischen UTP-Einbauraten und eingesetzter DNS-Konzentration bzw. Polymerasequantität waren bei beiden Kollektiven identisch.

Bei der durch Phenobarbital induzierten Lebervergrößerung besteht eine deutliche zeitliche und quantitative Beziehung zwischen der Steigerung der RNS-Synthese und dem Induktionsverlauf

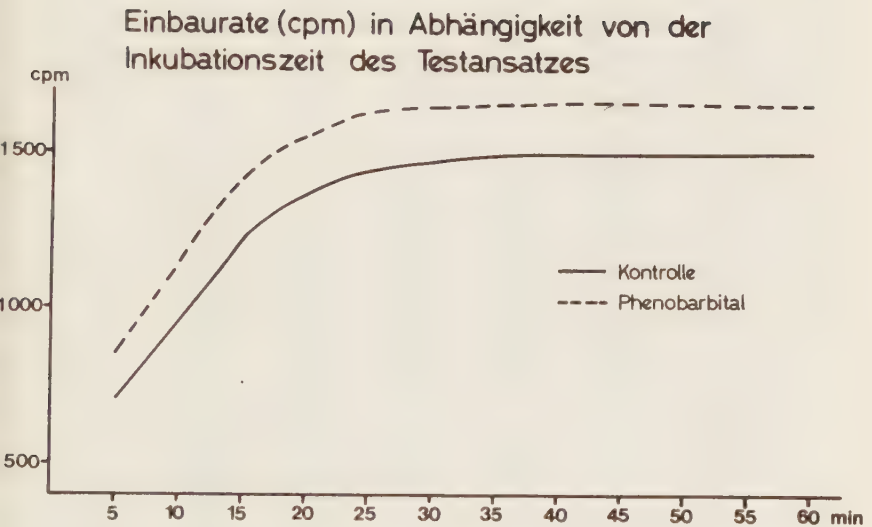


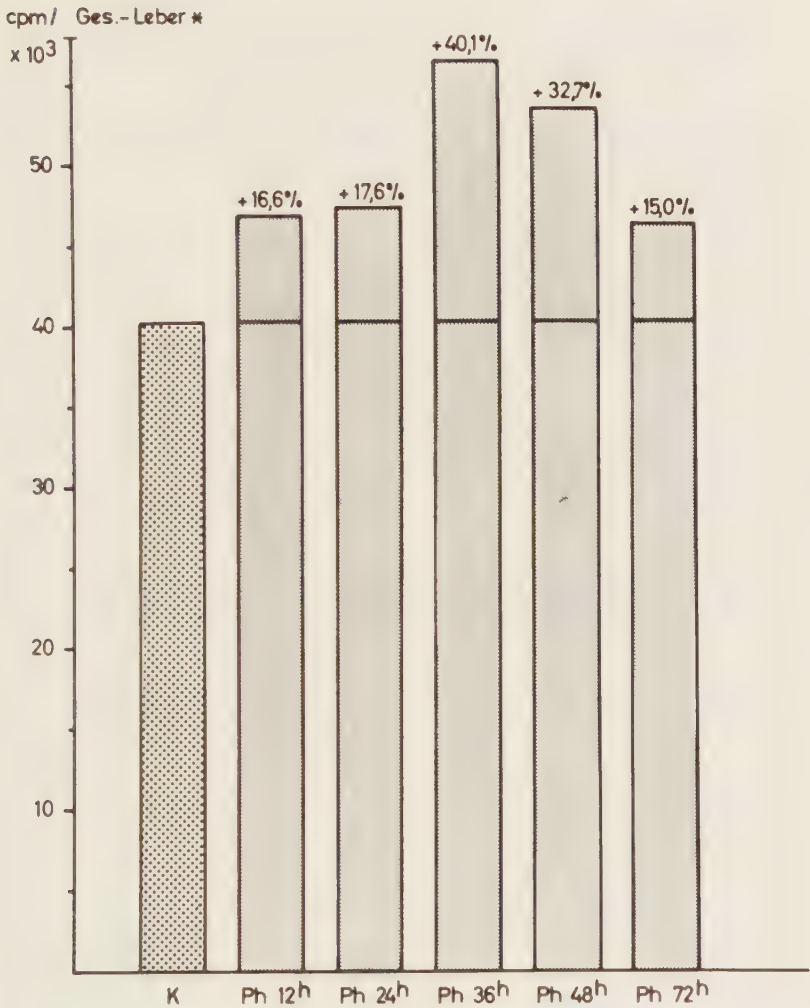
Abb. 13: Zeit-Wirkungskurve von Chromatin Phenobarbital-induzierter und unbehandelter Tiere.

der einzelnen Leberenzyme (GEIBEL, 1971; siehe Abb. 1). Der Einbau markierter Vorstufen in RNS beginnt in vivo etwa 14 Stunden nach Applikation des Pharmakons, also zum Zeitpunkt der Induktion der mikrosomalen Metabolisierungsenzyme, anzusteigen und erreicht nach 1 - 2 Tagen, synchron mit dem Gehaltsanstieg umfangreicher cytoplasmatischer und mitochondrialer Enzymsysteme ein Maximum.

Eine mögliche Beeinflussung der Matrizenaktivität war aufgrund dieser Befunde innerhalb des Zeitraums zwischen einem halben und vier Tagen nach Pharmakaapplikation zu erwarten. In einer orientierenden Versuchsreihe wurde deshalb die Matrizenfunktion von Chromatinen bestimmt, die in dem interessierenden Zeitraum zwischen der 12. und 72. Stunde der Induktionsphase gewonnen worden waren.

Die Ergebnisse sind im Säulendiagramm der Abb. 14 dargestellt. Es gibt die Einbauaktivität der Leber nach der jeweiligen Induktionszeit sowie die prozentuale Aktivitätssteigerung von Phenobarbitalchromatin im Vergleich mit Kontrollchromatin wieder. Das wesentliche Ergebnis dieser Versuche war die Feststellung, daß die Einbauaktivität dem Ausmaß von RNS- und Enzymsynthesen annähernd parallel laufend erhöht war. Die Aktivität stieg bereits nach 12 Stunden Phenobarbital-Applikation, also schon zum Zeitpunkt der Induktion endoplasmatischer Enzyme an; die maximale Aktivierung fand sich auch hier im Stadium der Gehaltszunahme der großen extramikrosomalen Enzymgruppen nach etwa 36 Stunden. In der vergrößerten Leber kehrte nach Abschluß der Enzymsynthesephase auch die erhöhte Matrizenaktivität wieder in den Normbereich zurück.

Bei einer summarischen Betrachtung der Matrizenaktivität unter Zugrundelegung aller durchgeführten Versuche ohne Berücksichtigung der Induktionszeit der Tiere fand sich bei den mit Phenobarbital induzierten Tieren bei allen Versuchen eine Steigerung der spezifischen ^{14}C -UTP-Einbauaktivität. Sie betrug im Mittel 25 % gegenüber den Kontrolltieren.



* die Gesamtleber wurde für ein 25g schweres Tier berechnet und auf Chromatin - DNS bezogen

Abb. 14: Matrizenaktivität und prozentuale Aktivitätssteigerung von Phenobarbital-Chromatin unterschiedlicher Induktionszeit.

	Zahl der Tiere n	Spez. ^{14}C -UTP- Einbau-Aktivi- tät d. sedimenti- erten Chromo- matins cpm/mg DNS	Δ %	^{14}C -UTP-Einbau- Aktivität des sedimentierten Chromatins von 1 g Leber cpm/ g F.G.	Δ %	^{14}C -UTP-Einbau- Aktivität des sedimentierten Chromatins der Gesamt-Leber cpm/L 25	Δ %
K	223	30.421		32.936		40.578	
Ph	223	38.115	+ 25,0	33.397	+ 1,4	47.395	+16,8

Tabelle 8: Beeinflussung der Matrizenaktivität durch Phenobarbital.
Mittelwert von je 223 NMRI-Mäusen.

In Tabelle 8 sind sowohl die spezifischen ^{14}C -UTP-Einbausraten in cpm/mg DNS als auch die auf 1 g Leber sowie die Gesamtleber eines 25 g schweren Tieres bezogenen Größen angegeben. Die Werte sind unter Zugrundelegung der DNS-Gehalte des sedimentierten Chromatins errechnet. Um jedoch auf das Ausmaß einer Änderung der Matrizenfunktion durch Phenobarbital in vivo schließen zu können, war es erforderlich, die Matrizenaktivität des nicht-sedimentierten "Überstands-Chromatins" mit zu berücksichtigen. Die Notwendigkeit der Korrektur ergab sich aus den in Tabelle 6 dargestellten Befunden, daß bei Phenobarbital-induzierter Leber vor allem in den frühen Induktionsstadien die nicht sedimentierende DNS-Fraktion beträchtlich vermehrt war. Wie bereits beschrieben, war die spezifische Einbauaktivität dieses nicht sedimentierenden Chromatins im Vergleich mit der des pelletierten Rohchromatins bei unbehandelten Tieren um mehrere Zehnerpotenzen erhöht. Es war zunächst zu prüfen, ob sich eine Steigerung in vergleichbarem Umfang auch bei der Überstandsfraction der induzierten Leber fand.

Tabelle 9: Beeinflussung der Matrizenaktivität von sedimentiertem und Überstands-Chromatin durch Phenobarbital

	K	Ph
Induktionszeit h		36
Zahl der Tiere n	33	33
Spezif. ^{14}C -UTP- Einbau-Aktivität des sedimentierten Chromatins cpm/mg DNS	53.265	61.119
Δ %		+ 14,7
Spezif. ^{14}C -UTP- Einbau-Aktivität der Überstände cpm/mg DNS	1.476.149	1.663.915
Δ %		+ 12,7

Die in Tab. 9 wiedergegebenen Versuchsdaten zeigen, daß die Erhöhung der spezifischen Einbauaktivität der Überstands-Chromatine gegenüber den sedimentierten Chromatinen bei beiden Kollektiven vollkommen identisch war. Deshalb war die Steigerungsrate der spezifischen Transcriptionsaktivität bei Überstands- und sedimentiertem Chromatin bei Phenobarbital-induzierten Tieren gegenüber den beiden Kontrollpräparationen ebenfalls gleich (Tab. 9).

Aufgrund dieser Befunde war es zulässig, für Phenobarbital- und Kontrolleber die Matrizenaktivität des Gesamtchromatins in gleicher Weise aus den Gehalten und der spezifischen Einbauaktivität von pelletiertem und nicht sedimentierenden Chromatinfractionen zu errechnen.

	K	Ph
Zahl der Tiere n	205	205
^{14}C -UTP-Einbau- aktivität des Ge- samtchromatins von 1 g Leber cpm/g F.G.	46.506	54.845
Δ %		+ 17,9
^{14}C -UTP-Einbau- aktivität des Ge- samtchromatins der Ges.-Leber ⁺ cpm/L 25	62.303	84.737
Δ %		+ 36,0

Tabelle 10: Beeinflussung der Matrizenaktivität durch Pheno-
barbital, bezogen auf Gesamt-Chromatin und
Gesamt-Leber⁺(L 25)

Tabelle 10 gibt die für 1 g Leber und für die Gesamtleber ermittelten Daten wieder, die unter der Minimalvoraussetzung errechnet wurden, daß Überstands-DNS die gleiche spezifische Einbauaktivität besitzt wie sedimentiertes Chromatin. Selbst unter dieser Annahme liegt die Steigerung der Matrizenaktivität durch Phenobarbital-Induktion (bezogen auf 1 g Leber) noch bei 18 %. Für die Gesamtleber (L 25) ergibt sich infolge der gleichzeitigen Organvergrößerung eine Erhöhung um 36 %. Wurden der Berechnung der Einbauaktivität des Gesamt-Chromatins die real gemessenen spezifischen Transcriptionsaktivitäten der pelletierten und nicht sedimentierten Chromatinfractionen zugrunde gelegt, so ergab sich für die induzierte Leber wegen ihres wesentlich größeren Anteils an Überstands-DNS mit höchster spezifischer Einbauaktivität eine noch erheblich stärkere Zunahme der Matrizenaktivität. Abb.15 gibt die so ermittelten Werte der Einzelfractionen und der Gesamtchromatine wieder.

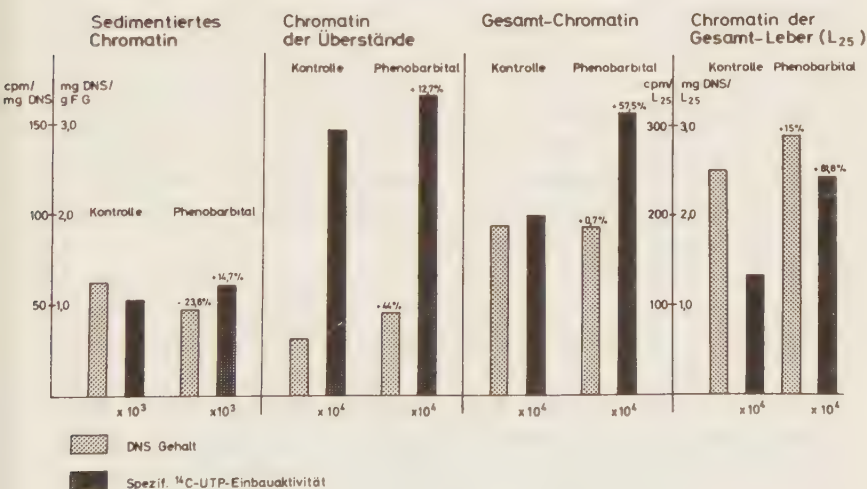


Abb. 15: DNS-Gehalt und ^{14}C -UTP-Einbauaktivität von pelletiertem, nicht sedimentiertem und Gesamtchromatin sowie von Chromatin der Gesamtleber (L 25) (jeweils unter Berücksichtigung der real gemessenen spezifischen Transcriptionsaktivitäten).

3.4.4. Bestimmung der Matrizenaktivität mit Rattenleber-Polymerase

Da alle bisher beschriebenen Versuche mit DNS-abhängiger RNS-Polymerase aus *E. coli* durchgeführt wurden, war es von Interesse zu prüfen, ob sich gleiche Befunde bei Verwendung einer für Leberchromatin organspezifischen Polymerase fanden. Die Bedeutung der Verwendung einer zur Matrix homologen Polymerase bei quantitativen Transcriptionsversuchen geht aus Untersuchungen von RICHTER (1972) und BUTTERWORTH (1971) hervor. Bei der Anwendung von Rattenleberpolymerase besteht außerdem die Möglichkeit, das für die mRNS-Synthese spezifische nucleoplasmatische Enzym (Polymerase B) von der die rRNS-Synthese katalysierenden nucleolaren Polymerase A zu trennen.

Die in Tabelle 11 dargestellten Versuchsergebnisse zeigen Werte, die in der Tendenz mit den unter Verwendung von Coli-Polymerase ausgeführten Versuchen vollständig identisch sind. Quantitativ ist die Erhöhung der Matrizenaktivität durch Phenobarbital-Induktion generell noch stärker ausgeprägt als bei Verwendung von Coli-Polymerase. Das ist besonders evident bei Polymerase B, bei deren Anwendung die Einbauaktivität in den Phenobarbital-induzierten Lebern wesentlich stärker erhöht ist als bei Anwendung der Polymerase A. Dieses Ergebnis steht zwar im Einklang mit der Tatsache, daß bei Phenobarbital-Induktion vor allem die mRNS-Synthese, die rRNS-Synthese kaum gesteigert wird (GEIBEL, 1971).

Es ist jedoch fraglich, ob die Wirkungsunterschiede bei Anwendung beider Polymerasen im Sinne einer bevorzugten Derepression der mRNS codierenden Chromatinanteile gedeutet werden kann, denn im *in vitro*-System transcribieren beide Polymerasen unspezifisch alle zugesetzten Chromatinarten, Polymerase B dabei mit besonderer Aktivität Einstrang-DNS. Die Unterschiede in der Einbauaktivität könnten demnach auch auf der bereits diskutierten Möglichkeit vermehrter Gehalte von Einstrang-DNS im induzierten Chromatin hindeuten.

	POLYMERASE A				POLYMERASE B		
	K	Ph	Δ %		K	Ph	Δ %
Spezif. ^{14}C -UTP-Einbauaktivität cpm/mg DNS	6.877	9.562			7.676	11.959	
			+ 39,0				+ 55,8
^{14}C -UTP-Einbauaktivität von 1 g Leber cpm/ g F.G.	8.576	10.486			9.573	12.330	
			+ 22,3				+ 28,8
^{14}C -UTP-Einbauaktivität der Gesamt-Leber cpm/L 25	12.379	17.957			13.817	22.459	
			+ 45,1				+ 62,5

Tabelle 11: Beeinflussung der Matrizenaktivität durch Phenobarbital.
 Prüfung mit Rattenleber-Polymerase A und B
 Induktionszeit: 36 Stunden
 Zahl der Tiere: je 20 K und Ph.

3.4.5. Wirkung von Phenobarbital auf Gehalte und Eigenschaften von Rattenleber-Chromatin

Aus Anlaß der Untersuchungen mit Rattenleberpolymerase wurde zur Sicherung der Vergleichbarkeit auch eine Versuchsreihe mit Rattenleberchromatin durchgeführt.

	K	Ph	Δ %
Zahl der Tiere n	8	8	
DNS-Gehalt des sedimentierten Chromatins mg/g F.G.	0,772	0,891	
DNS-Gehalt der Überstände mg/g F.G.	0,705	0,755	
DNS-Gehalt des Gesamt-Chromatins mg/g F.G.	1,477	1,646	+ 11,4
Chromatin-Ausbeute %	52,5	54,1	
Spezif. ¹⁴ C-UTP-Einbau-aktivität cpm/mg DNS	161.536	188.181	+ 16,5
¹⁴ C-UTP-Einbau-aktivität des Gesamt-Chromatins von 1 g Leber cpm/g F.G.	238.589	309.746	+ 29,8
¹⁴ C-UTP-Einbau-aktivität des Gesamt-Chromatins der Gesamt-Leber	239.073	307.488	+ 28,6

Tabelle 12: Beeinflussung des Chromatin-Gehaltes und der Matrizenaktivität durch Phenobarbital.
Versuchstiere: Ratten.

Der erste Teil der Tabelle 12 geht auf die Chromatingehalte ein und zeigt ein annähernd identisches Verhalten mit Mäuseleberchromatin. Das gleiche trifft für die Matrizenaktivität zu, die im Rattenleberchromatin im gleichen Umfang durch Phenobarbital-Induktion gesteigert wird, wie das bei Chromatin aus Mäuselebern der Fall ist. Überraschend war auch hier der relativ hohe Anteil an nicht sedimentiertem Chromatin, auf den sich in allen zitierten Originalarbeiten mit Rattenlebern als Ausgangsmaterial kein Hinweis findet. (BENJAMIN et al., 1966; MAYFIELD and BONNER, 1971 und 1972; MARUSHIGE and BONNER, 1971; ARNOLD et al., 1972).

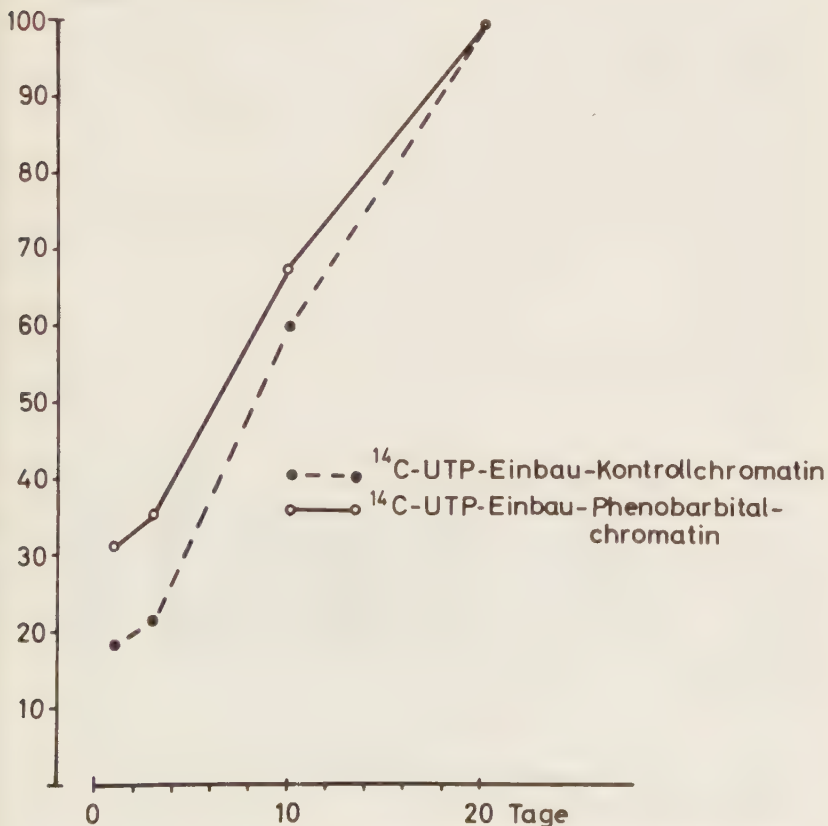


Abb. 16: Veränderung der Transcriptionsrate in Abhängigkeit von der Aufbewahrungszeit isolierten Chromatins aus induzierter und unbehandelter Leber.

3.5. Untersuchungen zur Analyse der Transcriptionssteigerung von Leberchromatin Phenobarbital-induzierter Tiere.

Die bisher dargestellten Resultate haben gezeigt, daß die durch Applikation von Phenobarbital induzierte Synthesesteigerung von Leberenzymen und die dadurch bedingte Organvergrößerung initial auf einer Erhöhung der Transcriptionseffektivität des Chromatins beruht. Einige Befunde machen es wahrscheinlich, daß dafür nicht nur eine Steigerung des Ableseprozesses durch erhöhte Polymeraseaktivität (GELBOIN et al., 1967), sondern vor allem eine vermehrte Derepression von Genanteilen verantwortlich ist. Dafür spricht unter anderem die in Abb. 16 dargestellte Beobachtung, daß beim Anstieg der Transcriptionsaktivität im Laufe der in-vitro-"Alterung" von Chromatin bei längerem Aufbewahren die zwischen den Präparationen aus normaler und induzierter Leber bestehenden Aktivitätsunterschiede zunehmend verschwinden. Die schon von MARUSHIGE und BONNER beschriebene Zunahme der Transcriptionsrate bei "alterndem" Chromatin (MARUSHIGE et al., 1966) beruht nach BARTLEY u.a. (BARTLEY et al., 1970, BUTTERWORTH et al., 1971) auf einem kontinuierlichen Abbau reprimierender Komponenten durch Proteasen. Aus den in Abb. 16 dargestellten Verläufen ist danach zu schließen, daß bei der Phenobarbitalinduktion in vivo Repressionsfaktoren von der Matrize abgetrennt wurden. Bei mehreren hormonale Enzyminduktionen wurde eine Derepression von Genorten durch spezifische Bindungen oder Wechselwirkungen der Hormone mit Repressoren wahrscheinlich gemacht (SEKERIS et al., 1965). Da die durch Phenobarbital induzierten Enzymsynthesen in qualitativ und quantitativ gleicher Weise durch zahlreiche chemisch und pharmakologisch sehr heterogene Substanzen ausgelöst werden, war es schwer vorstellbar, daß die Wirkung dieser unphysiologischen Stoffe auf ähnlich spezifischen Mechanismen beruht wie die der Hormone. Die einzige stoffliche Übereinstimmung dieser sonst unterschiedlichen Fremdstoffe mit enzyminduzierender Wirkung besteht in ihren polar - unpolaren Moleküleigenschaften und den dadurch bedingten physikalisch-chemischen Wirkungen.

Es war daher naheliegend, zunächst zu prüfen, ob die nachgewiesene Derepression des Chromatins vollkommen unspezifisch darauf beruht, daß Repressionsfaktoren ähnlich einer Detergens-Wirkung abgelöst werden.

3.5.1. Wirkung von Phenobarbital in vitro

Zur Beurteilung einer möglichen Bedeutung derartiger unspezifischer physikalisch-chemischer Substanzwirkungen für die Erhöhung der Matrizenaktivität wurde Phenobarbital in vitro in verschiedenen Konzentrationen (10^{-3} - 10^{-8}) mit Chromatin unbehandelter und induzierter Tiere inkubiert und anhand des ^{14}C -UTP-Einbaus die Transcriptionsaktivität gemessen. Die Resultate sind in Abb. 17 dargestellt.

Phenobarbital in vitro

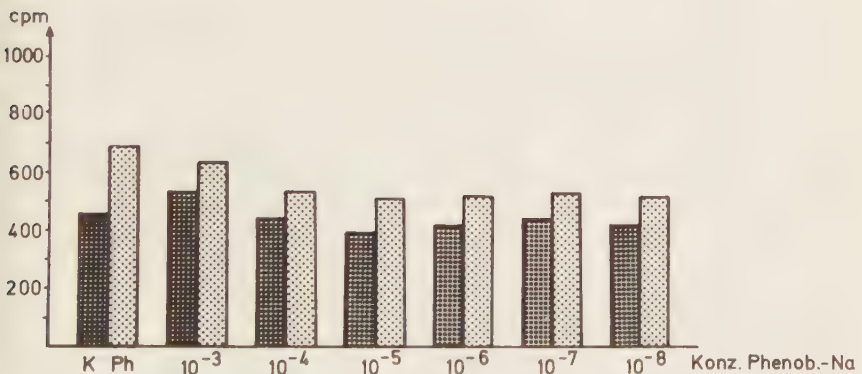


Abbildung 17

Weder bei Kontroll- noch bei Phenobarbital-Chromatin wurde die Matrizeneffektivität über den in der Methodik liegenden Schwankungsbereich hinaus verändert.

Da sich nach diesen Versuchen eine grobe physikalisch-chemische Ablösung von Repressionsfaktoren ebenso wie eine spezifische Wechselwirkung als Ursache der Transcriptionssteigerung ausschließen ließ, mußte die Wirkung über eine Beeinflussung physiologischer Mechanismen erfolgen. Es konnte sich dabei um substantielle Faktoren oder um ein funktionelles Prinzip handeln. Um erste Hinweise zu erhalten, wurde untersucht, ob die Matrizenaktivität von Chromatin unbehandelter Tiere durch verschiedene Zellkomponenten aus induzierter Leber beeinflusst werden kann. Anlaß dazu war der Befund, daß Cytosol aus teilhepatektomierter Leber bei in-vitro-Inkubation die Transcription normaler Zellkerne steigert (THOMPSON, 1968). In Übereinstimmung damit fand GEIBEL (1971), daß Zusatz von Cytoplasma aus induzierter Leber die in vitro-RNS-Synthese in Leberzellkernen unbehandelter Tiere signifikant erhöht.

3.5.2. Beeinflussung der Transcription durch cytoplasmatische Fraktionen

In einer dem Versuchsaufbau von GEIBEL analogen Anordnung wurde die Beeinflussung der ^{14}C -UTP-Einbaurate von Chromatin durch in vitro-Zusatz von Cytoplasma-Präparationen aus induzierter Leber geprüft. Tab. 13 zeigt die Wirkungen von Cytosol (105.000 x g-Überstand von Leberhomogenat) aus unbehandelter und induzierter Leber auf die Matrizenfunktion von Kontroll- und Phenobarbital-Chromatin.

Die mit Zellkernen erhobenen Befunde von GEIBEL konnten in keinem Fall bestätigt werden. Innerhalb eines weiten Schwankungsbereichs führte Cytosol von Kontrolltieren und von unterschiedlich lange induzierten Tieren bei Kontroll- und

Induktionsdauer bei Präparation von Phenobarbi- tal - Cytosol h	Zahl der Versuche n	KONTROLL - CHROMATIN				PHENOBARBITAL - CHROMATIN			
		ohne Zusatz cpm/mg DNS 45.588 = 100 %	+ Kontroll- Cytosol %	+ Phenobar- bital- Cytosol %	ohne Zusatz cpm/mg DNS 44.072 = 100 %	+ Kontroll- Cytosol %	+ Pheno- barbital- Cytosol %		
12	4		115	94		88		82	
24	3		110	78		116		92	
36	7		86	99		84		88	
48	4		104	114		93		112	

Tabelle 13: Beeinflussung der Matrizenaktivität von Kontroll- und Phenobarbital-Chromatin durch Cytosol (105.000 x g-Überstand von Leberhomogenat) aus unbehandelter und induzierter Leber

Phenobarbital-Chromatin ohne erkennbare Gesetzmäßigkeit zu Steigerung und Senkung der Transcriptionsrate.

Da durch Phenobarbital initial das mikrosomale Enzymsystem induziert wird, wurden die gleichen Untersuchungen mit dem Cytoplasma und Mikrosomen enthaltenden 10.000 x g-Überstand durchgeführt.

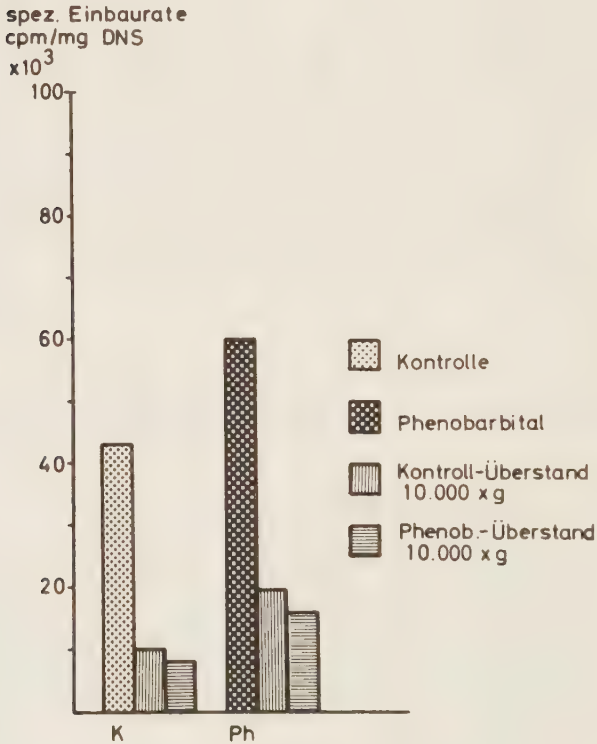


Abb. 18: Beeinflussung der Transcriptionsrate von Kontroll- und Phenobarbitalchromatin durch Cytosol (10.000 x g-Überstand).

Das Säulendiagramm in Abb. 18 zeigt, daß dabei ebenfalls ohne Unterschied zwischen Kontroll- und Phenobarbitalfraktion die ^{14}C -UTP-Einbauaktivität sehr stark vermindert wurde.

Die Divergenz zwischen den bei identischer Versuchsanordnung mit Zellkernen und Chromatin erhaltenen Ergebnissen ist möglicherweise im methodischen Bereich begründet und wird in der Diskussion eingehend erörtert. Ungeachtet dieser Deutungsmöglichkeit erscheint es denkbar, daß die Divergenz der Befunde durch die biologische Wirkungsweise bedingt ist. Es ist sehr wohl möglich, daß Cytosol nicht unmittelbar das genetische Material des Zellkerns beeinflusst, sondern daß die Wirkungen von Funktionseigenschaften des Cytoplasma ausgehen und über die Beeinflussung von Kernfunktionen verlaufen.

3.5.3. Beeinflussung der Transcription durch Substanzen mit Redoxfunktion

Als mögliches funktionelles Prinzip der Transcriptionsbeeinflussung war die bei der Pharmakainduktion sehr ausgeprägte Veränderung der zellulären Redoxlage zu diskutieren.

Eine gemeinsame biochemische Wirkung von Phenobarbital und allen übrigen induzierenden Pharmaka besteht in der primären Aktivierung NADP·H-verbrauchender enzymatischer Reaktionen (KUNZ et al., 1966). Da die NADP·H regenerierenden Enzyme den starken NADP·H-Verbrauch nicht zu kompensieren vermögen, kommt es in den Initialstadien zu einer ausgeprägten Positivierung des $\text{NADP}^+/\text{NADP}\cdot\text{H}$ -Systems.

3.5.3.1. Wirkung von Redoxindikatoren

Über eine Abhängigkeit der Transcription von der Redoxlage des Transcriptionssystems liegen bisher keine Untersuchungen vor.

Zur orientierenden Beobachtung wurde deshalb die Wirkung einer Reihe von reversiblen Redoxindikatoren mit verschiedenem pH auf

das Transcriptionsverhalten von unbehandeltem und induziertem Chromatin geprüft.

Dichlorphenolindophenol, Methylenblau, Ascorbinsäure und Glutathion wurden jeweils in einer 10^{-3} molaren Endkonzentration dem Inkubationsansatz zugegeben. Die Veränderung der Matrizenaktivität im Vergleich mit unter identischen Bedingungen untersuchten Kontrollansätzen ist in Abb. 19 als Säulendiagramm dargestellt.

Die Transcriptionsaktivität unbehandelter und induzierter Chromatine wurde durch Stoffe mit positivem Redoxpotential gesenkt, besonders stark durch Zusatz von Methylenblau, das reduzierende Glutathion bewirkte umgekehrt eine geringe Steigerung.

Beeinflussung der spezif. Einbaurrate nach Zugabe von Oxidations- bzw. Reduktionsmitteln

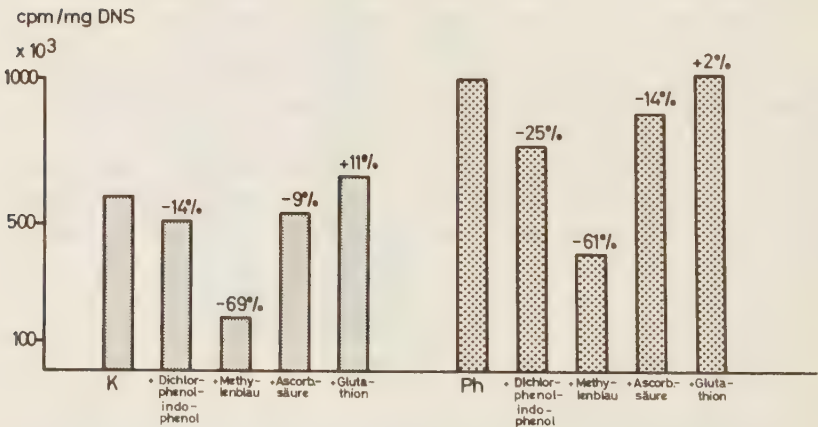


Abbildung 19

Nach diesen Modellversuchen wurde geprüft, ob zelluläre Redoxsysteme analoge Wirkungen besitzen.

3.5.3.2. Veränderung der $\text{NADP}^+/\text{NADP}\cdot\text{H}$ -Relation

Besonderes Interesse galt aufgrund der oben genannten Zusammenhänge dem Einfluß von NADP^+ bzw. $\text{NADP}\cdot\text{H}$ auf die Transkriptionsaktivität von Chromatin.

Zu diesem Zweck wurde NADP^+ bzw. $\text{NADP}\cdot\text{H}$ in einer Endkonzentration von 1 % zum Inkubationsansatz zugegeben. Um den gewünschten Reduktions- bzw. Oxidationszustand der Pyridinnucleotide bei längerer Inkubation konstant zu erhalten, wurden in Parallelansätzen oxidierende bzw. reduzierende enzymatische Regenerationssysteme zugesetzt. Als NADP^+ reduzierendes Regenerationssystem wurde dem $\text{NADP}\cdot\text{H}$ enthaltenden Testansatz

Glucose-6-phosphat in einer Endkonzentration von 1 %
sowie

Glucose-6-phosphatdehydrogenase
(5 μl einer 1:1 verdünnten Enzymlösung)

zugegeben. Das $\text{NADP}\cdot\text{H}$ oxidierende Regenerationssystem bestand aus:

α -Ketoglutar säure (Endkonzentration 1 %)

und

Glutamatdehydrogenase
(5 μl einer 1:1 verdünnten Enzymlösung).

Das Säulendiagramm in Abb. 20 zeigt, daß regelmäßige, in die gleiche Richtung gehende Wirkungen vorhanden sind. $\text{NADP}\cdot\text{H}$ -Zusatz bewirkt eine geringe Steigerung, NADP^+ eine ausgeprägte Hemmung der Matrizenaktivität. Die Tendenz der Steigerung bzw. Hemmung, die sich bei Zugabe der Redoxindikatoren alleine andeutet, wird bei Zusatz des regenerierenden Systems noch verdeutlicht.

Da bei Pharmaka-Induktion in der Zelle, wie dargestellt, die $\text{NADP}\cdot\text{H}$ -Konzentration absinkt, die NADP^+ -Konzentration ansteigt und damit die Redoxlage stark nach der oxidierten Seite verschoben ist, wäre - bei Zugrundelegung der oben angeführten

Beeinflussung der Matrizenaktivität von Chromatin durch NADP⁺ und NADPH

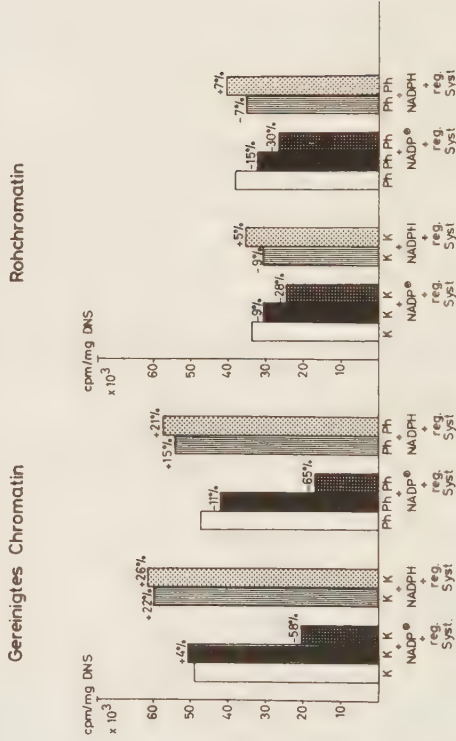


Abbildung 20

Versuchsergebnisse - demnach eine Senkung, keinesfalls jedoch eine Steigerung der RNS-Synthese zu erwarten. Eine direkte Wirkung der Redoxlage auf den Transcriptionsprozeß kann als Ursache der Synthesesteigerung deshalb ausgeschlossen werden.

3.5.4. Beeinflussung der Transcription durch "chromosomale RNS"

Eine mögliche indirekte Regulationswirkung der Redoxlage des $\text{NADP}^+/\text{NADP}\cdot\text{H}$ -Systems ergibt sich aus dem von BONNER et al. (1968) postulierten Konzept einer spezifischen Genregulation durch chromosomale RNS-Fraktionen ("regulator"- oder cRNS).

Diese aus Geweben verschiedener Organe und Spezies von BONNER et al. isolierten und charakterisierten RNS-Fraktionen besitzen einen sehr hohen Anteil an Dihydropyrimidinen. Da in der induzierten Leber als Folge der verminderten $\text{NADP}\cdot\text{H}$ -Konzentration die Aktivität der Pyrimidinreduktasen sehr stark, teilweise bis zum völligen Verlust, abfällt, erscheint es denkbar, daß über eine verminderte Bildung oder Funktion dieser chromosomalen RNS-Moleküle ein Eingriff in die Transcriptionsregulation erfolgt.

Zur Beurteilung dieses weitgehend hypothetischen Prinzips isolierten wir bei unbehandelten und induzierten Tieren nach den Angaben von BONNER et al. (vgl. Material und Methoden 2.6.) die chromosomalen RNS-Fraktionen mit den für diese niedermolekulare RNS angegebenen Eigenschaften, die bei Anwendung verschiedener Charakterisierungsverfahren, wie Chromatographie über DEAE-Sephadex, Polyacrylamid-Gelelektrophorese, Dichtegradientenzentrifugation, MÄK-Chromatographie u.a. nachgewiesen wurden. Zur weiteren Charakterisierung ihrer Eigenschaften und Funktion wurden zwei Wege beschritten:

1. Es wurde untersucht, ob Chromatin unbehandelter und induzierter Tiere unterschiedliche Quantitäten an cRNS aufwies, und ob sich die chromosomale RNS der beiden Kollektive in ihren Dihydropyrimidin-Gehalten unterschied.
2. Im Rekombinationsversuch wurden die isolierten und gereinigten cRNS-Fraktionen mit Chromatin unbehandelter und induzierter Tiere sowie mit Lachssperma-DNS inkubiert.

	"freie" cRNS [DOC - cRNS, proteinfrei]				"Proteingebundene" cRNS [CsCl - cRNS + Protein; Pellikel]			
	Zahl der Versuche n	K	Ph	Δ % K - Ph	Zahl der Versuche n	K	Ph	Δ % K - Ph
cRNS-Gehalt $\mu\text{g} / \text{g F.G.}$	je 5	15,8	49,0	+ 210	je 22	44	38	- 13,7
$\mu\text{g}/\text{mg}$ Chromatin-DNS		13,1	48,0			36,4	31,4	
$\mu\text{g}/\text{mg}$ Chromatin-RNS		112,9	350,0			314,3	271,4	
$\mu\text{g}/\text{mg}$ Gesamt- zell-RNS		2,59	8,03			7,2	6,2	
β -Alanin-Gehalt m μ mol/mg cRNS	je 5	456	381	- 16,4	je 10	135	110	- 19,5
Dihydrouracil- Gehalt m μ mol/mg cRNS		793	635			192	157	
mol %		26,4	21,2			6,43	5,24	

Gesamt-cRNS								
		K		Ph				
$\mu\text{g} / \text{g F.G.}$		59,8		87,0				
$\mu\text{g}/\text{mg}$ DNS		33,75		39,7				

Tabelle 14: Quantitative Zusammensetzung der cRNS-Fractionen aus Chromatin unbehandelter und induzierter Tiere.

Zugesetzte Fraktion: "freie" cRNS [DOC-cRNS, proteinfrei]	Zahl der Versuche n		KONTROLL- CHROMATIN		Zahl d. Vers. n		Zahl d. Versuche n		DNS aus Lachssperma	
	K	Ph	K	Ph	K	Ph	K	Ph	K	Ph
	Δ %	Δ %	Δ %	Δ %	Δ %	Δ %	Δ %	Δ %	Δ %	Δ %
3	+ 24	+ 6			4	- 12	- 15	1	- 60	- 14
"Proteingebundene" cRNS (Pellikel) [CsCl-cRNS + Protein]	3	+ 25	+ 2		3	- 7	+ 2	1	+ 33	+ 0
"Proteingebundene" cRNS (Phosphatase-verdaut) [CsCl-cRNS, proteinfrei]	2	+ 10	+ 19		2	+ 19	+ 27	1	- 17	+ 6
Proteinanteile nach Säulentrennung 1) aus Na DOC-Übst. 2) aus CsCl-Pellikel	1 2		- 9 + 9		1 2	- 14	- 14	1		- 14

Tabelle 15: Beeinflussung der Matrizenaktivität von Chromatin und DNS durch Fraktionen der cRNS-Präparation (vgl. Schema S. 19), angegeben als prozentuale Abweichung vom Ausgangswert.

Die Resultate sind in Tab. 14 und 15 zusammengefaßt und erlauben folgende Aussage:

Induziertes Chromatin enthielt weniger Protein-gebundene cRNS als Chromatin aus unbehandelter Leber. Der durch DOC dissoziierbare freie Anteil der cRNS war umgekehrt bei induziertem Chromatin erhöht. Der Dihydrouracil-Anteil der cRNS-Fraktion von Kontroll- und Phenobarbital-Chromatin wechselte stark und zeigte bei 28 Bestimmungen keine signifikanten Unterschiede.

Beim Rekombinationsversuch wurde die Transcriptionsrate von Kontroll-Chromatin gering gesteigert, und zwar durch alle cRNS-Fraktionen, die von Phenobarbital-Chromatin verhielt sich uneinheitlich; ohne erkennbare Gesetzmäßigkeit fanden sich in sehr unterschiedlichem Ausmaß sowohl Steigerungen als auch Hemmungen der Transcriptionsaktivität.

Die nach der oben angeführten Theorie zu erwartende Hemmung von Phenobarbital-Chromatin bei Inkubation mit cRNS-Fraktionen aus unbehandelter Leber konnte durch unsere Versuche nicht untermauert werden.

Bei der Wertung dieser negativen Ergebnisse müssen jedoch die in der Diskussion eingehend besprochenen Faktoren berücksichtigt werden.

4. D I S K U S S I O N

4.1. Eigenschaften und Funktion von Leberchromatin unbehandelter Tiere

Ziel der vorliegenden Untersuchung war es zu klären, ob die durch Applikation von Phenobarbital und anderen Pharmaka induzierte Synthesesteigerung von Leberenzymen und die dadurch bedingte Organvergrößerung auf einer Zunahme des Matrizenmaterials, einer Erhöhung der Matrizenaktivität durch vermehrte Derepression von Genorten oder auf einer anderweitigen Stimulierung des Transcriptionsprozesses beruht. Durch gleichzeitige Analysen der Matrizenfunktion, der chemischen Zusammensetzung und der strukturellen Eigenschaften des Chromatins sollten dabei Hinweise auf die molekularen Grundlagen der Transcriptionsbeeinflussung erhalten werden.

Um Aussagen über Gehalt, Funktionszustand und Eigenschaften des genetischen Zellmaterials in vivo machen zu können, war es notwendig, für die in-vitro-Analysen das Chromatin weitgehend quantitativ und in seinem nativ vorliegenden Status zu isolieren. Diese Forderung erfüllte unter den zahlreichen mitgeteilten Präparationsmethoden optimal eine leicht modifizierte Form des von MAYFIELD und BONNER angegebenen Verfahrens. Es wurde damit ein "Rohchromatin" erhalten, das sich durch konstante Zusammensetzung sowie durch ausreichend hohe und bei vergleichbaren Präparationen nur geringfügig schwankende Matrizenaktivität auszeichnete. Die Zusammensetzung von DNS : RNS : Histon- : Nichthistonprotein betrug innerhalb eines geringen Schwankungsbereichs 1 : 0,12 : 0,97 : 0,74 und entsprach damit zufriedenstellend den in der Literatur für Chromatin aus Rattenleber angegebenen Werten (DAHMUS und BONNER, 1970; DAHMUS und McCONNEL, 1969). Eine zusätzliche Reinigung durch Saccharosegradienten-Zentrifugation brachte wegen der geringen Abtrennung von Protein und RNS und des vergleichsweise hohen Verlustes an DNS keinen weiteren Vorteil.

Die aus dem DNS-Ausgangsgehalt des zur Präparation verwendeten

Lebergewebes und dem DNS-Gehalt des sedimentierten Chromatins errechnete Ausbeute lag zwischen 50 und 95 % mit einem Mittelwert bei 64 %. Obwohl dieser Wert im Vergleich mit der nur 13 %igen Chromatinausbeute bei Anwendung der Präparation nach HUANG/DAHMUS sehr günstig war, veranlaßte der Präparationsverlust von 20 - 40 % zu eingehenderen Analysen. In der Literatur werden nur sehr vereinzelt Angaben über die Höhe der Ausbeute gemacht. MARUSHIGE und BONNER (1966) geben für ihre Extraktionsmethode mit einem EDTA-Salz-Medium eine Chromatinausbeute von 80 % an. DAHMUS und McCONNELL (1969) erreichten bei Novikoff-Hepatoma-Zellen mit der gleichen Methode, unabhängig von EDTA-Zusatz, Ausbeuten von 70 bis 80 %. Die zahlreichen übrigen Untersucher, die diese Methoden, teilweise in modifizierter Form, anwandten, setzen diese Angaben der Ausgangsmethoden voraus und teilen keine Daten über ihre experimentell ermittelte Ausbeute mit.

Es war naheliegend, die Ursachen des höheren Chromatinverlustes bei den eigenen Versuchen im methodischen Bereich zu suchen; vor allem schien es möglich, daß Chromatin aus Mäuselebern andere Sedimentations- und Löslichkeitseigenschaften besitzt und deshalb bei Anwendung des für Rattenleber ausgearbeiteten Verfahrens (MAYFIELD und BONNER, 1971) nur unvollständig sedimentiert wird. Die darauf durchgeführten Versuche zeigten jedoch, daß die Chromatinausbeute bei Mäuseleber auch durch verlängerte Zentrifugationszeiten und erhöhte g-Zahlen nicht grundlegend verbessert werden kann. Außerdem wurde bei der Präparation von Chromatin aus Rattenleber mit der von uns angewandten Methode Ausbeuten erhalten, die denen der Mäuseleber entsprachen.

Aus der Fragestellung der Arbeit ergab sich die Notwendigkeit zu untersuchen, ob das im Überstand verbleibende Chromatin identische Eigenschaften wie das sedimentierte Chromatin besitzt, oder ob sich beide Formen hinsichtlich Zusammensetzung, Struktur und Funktionsaktivität unterscheiden. Wichtigstes Ergebnis dieser Analysen war die Feststellung, daß die spezifische Transcriptionsaktivität der nicht sedimentierenden

DNP-Fractionen die des sedimentierten Chromatins um ein Vielfaches übersteigen. Bei vergleichenden Analysen der chemischen und physikalischen Eigenschaften beider Chromatinfractionen ließen Schmelzprofile und Sedimentationsverhalten auf strukturelle Unterschiede und auf differente Molekülgrößen schließen. Es kann deshalb angenommen werden, daß die stark erhöhte Einbauaktivität der Überstandsfraktionen nicht methodisch bedingt ist, sondern auf den spezifischen Eigenschaften dieser Chromatinform beruht. Von Bedeutung könnten nach diesen Analysen ein erhöhter Derepressionsgrad, eine niedrigere Molekülgröße, möglicherweise auch ein erhöhter Anteil an einsträngiger DNS sein, Faktoren, die nachweislich eine erhöhte Transcriptionsaktivität bewirken. Durch welche in vivo- oder in vitro-Bedingungen diese nicht sedimentierenden DNP-Formen entstehen, und ob sie definierten Funktionszuständen der Zelle zuzuordnen sind, kann noch nicht sicher beantwortet werden. Denkbar schien zunächst, daß es sich dabei um niedermolekulare DNS-Stücke vor dem Zusammenfügen durch DNS-Ligase handelt. Da die Maus einen ausgeprägten Circadianrhythmus mit S-Phase zwischen 2 und 6 Uhr, Mitosemaximum zwischen 12 und 14 Uhr und G1-Phase zwischen 14 und 16 Uhr besitzt, war die Beurteilung dieser Möglichkeit durch Untersuchung an zwei geeigneten Tageszeitpunkten zu erreichen. Die daraufhin durchgeführten Versuche zeigten, daß der Anteil an nicht sedimentierenden DNP-Teilen bei Präparation in der am Nachmittag liegenden G1-Phase, in der noch nicht ligierte DNS-Anteile nicht zu erwarten sind, höher lag als in der prämitotischen Phase mit hohem Gehalt an niedrigmolekularer DNS. Die höchsten Gehalte an Überstandschromatin fielen demnach zeitlich in die Phase der stärksten RNS-Synthese. Das macht wahrscheinlich, daß es sich dabei um funktionsaktives Chromatin handelt, das wegen seiner aufgelockerten Struktur schwerer sedimentiert; möglicherweise auch wegen der damit verbundenen größeren Labilität bei der Präparation mechanisch von den hochmolekularen dichtgepackten Chromatinanteilen abgeschert wird. Für die Richtigkeit dieser Deutung spricht außerdem, daß eine oft

beobachtete Abhängigkeit der nicht sedimentierenden Chromatinquantität von Alter und Eingewöhnungszeit der Mäuse bestand. Einen hohen DNS-Anteil im Überstand wiesen zu- meist junge Tiere auf und solche, die sich unmittelbar nach dem Eintreffen vom Züchter an die neuen Stall- und Ernährungsbedingungen adaptierten; beides Bedingungen, die nachgewiesenermaßen mit erhöhter Syntheseaktivität der Le- ber verbunden sind (GEIBEL, 1971). Insgesamt sprechen die- se Ergebnisse dafür, daß es sich beim Überstandschromatin um strukturell und funktionell vom sedimentierten Chroma- tin unterschiedliche DNS-Formen handelt. Möglicherweise ent- hält es bevorzugt die in vivo dereprimierten DNS-Abschnitte. Wegen der weitreichenden Bedeutung dieser Folgerung muß diese Annahme durch weitere Untersuchungen mit geeigneter Anordnung, wie Trennung über Hydroxylapatit und Polylysin- Bindung gesichert werden.

Diese Hinweise, daß die in vivo funktionsaktiven Genanteile bei Anwendung der gebräuchlichen Methode zur Chromatinprä- paration möglicherweise nur unvollständig erfaßt werden, hat- ten für die Analysen zur quantitativen Beurteilung der Ma- trizenfunktion in vivo und deren Beeinflussung durch induzie- rende Pharmaka erhebliche Konsequenzen. Es war danach zu be- rücksichtigen, daß sich eine Steigerung der Chromatinfunktion in vivo nicht in einer erhöhten Transcriptionsaktivität des isolierten Chromatins, sondern überwiegend in einem Ansteigen des nicht sedimentierten DNS-Anteils widerspiegelt. Deshalb mußte neben den Gesamtchromatingehalten auch die anteil- mäßige Verteilung in die sedimentierenden und im Überstand verbleibenden Komponenten sowie die Transcriptionsaktivität beider Fraktionen bestimmt werden.

4.2. Gehalte, Eigenschaften und Funktion von Leberchromatin während der Enzyminduktion durch Phenobarbital

Die DNS-Gehalte der Leber als quantitatives Maß der gesamten, dem Organ zur Verfügung stehenden Chromatinmenge blieben während der Phase der stärksten Syntheseaktivität mit Ausnahme einer geringen Steigerung nach 24 Stunden annähernd konstant und stiegen erst nach 3 Tagen, der Organvergrößerung entsprechend, an. Dieser Verlauf steht im Einklang mit den unter gleichen Bedingungen bei cytometrischen und autoradiographischen Analysen gefundenen Veränderungen (SCHAUDE, 1972). Als Äquivalent der ersten geringen Chromatinzunahme findet sich nach 24 Stunden ein Anstieg des Thymidinindex mit nachfolgender Mitosewelle, im Stadium der späteren Phase der deutlichen Chromatinzunahme ein erhöhter Thymidineinbau mit zunehmender Polyploidisierung der Zellkerne. Es kann nach diesen Befunden wegen der zeitlichen Divergenz der Maxima von DNS- und Proteinzunahme ausgeschlossen werden, daß die gesteigerte Enzymsynthese auf einer initialen Vermehrung der Matrizenquantität beruht.

Das wesentliche Ergebnis der vorliegenden Arbeit war der sichere Nachweis, daß die spezifische Einbauaktivität von Chromatin aus induzierter Leber erhöht ist. Bei einem Kollektiv von 223 Tieren wurde eine durchschnittliche Erhöhung von 25 % ermittelt. Die Steigerung begann geringfügig nach 12 Stunden, also schon zum Zeitpunkt der Induktion endoplasmatischer Enzyme, erreichte ein Maximum nach 36 Stunden im Stadium der Gehaltzunahme der großen extramikrosomalen Enzymgruppen und fiel bei Erreichen des neuen Enzymgleichgewichts wieder ab. Dieser zeitliche Verlauf entspricht vollkommen der Steigerung der RNS-Synthese in vivo (GEIBEL, 1971) und korreliert sinnvoll mit Sequenz und Verlauf der Enzymsynthesen (Abb. 1).

Um die Erhöhung der Synthesekapazität der Leber in vivo annähernd quantitativ beurteilen zu können, mußte aus der spezifischen Einbauaktivität (cpm/mg DNS) und den DNS-Gesamt-

gehalten die Einbauraten des Gesamtchromatins errechnet werden. Das war wegen der schon eingehend erörterten Differenzierung des Chromatins in eine sedimentierende und eine nicht sedimentierende Fraktion mit sehr unterschiedlichen spezifischen Einbauaktivitäten problematisch. In der induzierten Leber war der Anteil an Überstands-Chromatin mit höchster spezifischer Einbauaktivität vor allem in den frühen Induktionsstadien erheblich erhöht. Dieser Befund stützte die aus den Analysen zur Charakterisierung der nicht sedimentierenden Chromatinformen abgeleitete Annahme, daß es sich hierbei bevorzugt um in vivo funktionsaktive Genanteile handelt.

Es schien danach berechtigt, zur Ermittlung der Transkriptionskapazität des Gesamtchromatins die experimentell ermittelten Werte von Gehalt und spezifischer Einbauaktivität der einzelnen Chromatinfraktionen zugrunde zu legen. Unter dieser Voraussetzung betrug die Steigerung der RNS-Synthesekapazität durch Phenobarbital-Induktion für 1 g Leber 57,5 %, für die Gesamtleber berechnet 82 %.

Um die Grenzwerte zu kennzeichnen, wurden außerdem die gleichen Berechnungen unter der Minimalvoraussetzung durchgeführt, daß bei beiden Kollektiven die Überstandsfractionen die gleiche spezifische Einbauaktivität besitzen wie die zugehörigen Rohchromatine. Der so erhaltene Minimalwert für die Transcriptionssteigerung in der induzierten Leber betrug pro g Gewebseinheit noch 18 % und für die Gesamtleber wegen der Organvergrößerung 36 %. Bei orientierenden Versuchen mit Ratten wurde eine nahezu identische Steigerung der Matrizenaktivität gefunden. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit Untersuchungen von BRESNICK et al. (1967) und PIPER et al. (1968), die nach Induktion mit 3-Methylcholanthren bei der Ratte eine Steigerung der Matrizeneffektivität des Leberchromatins von etwa gleicher Größenordnung fanden. Da sich die Steigerung der in vitro RNS-Synthese nur bei Verwendung von nativem Chromatin fand, jedoch nicht mehr bei der durch Salz- oder Säureextraktion vom Proteinanteil befreiten DNS-Matrize dieser Präparationen, schlossen beide Autoren, daß

die Pharmakainduktion auf einer vermehrten Derepression von Genanteilen beruht. Diese Untersuchungen wurden ebenso wie die eigenen Analysen unter Verwendung von bakterieller Polymerase durchgeführt. Für quantitative Transcriptionsversuche zur Wirkungsanalyse von Repressions- und Derepressionsfaktoren scheint jedoch nach Beobachtungen von BUTTERWORTH (1971) und RICHTER (1972) der Polymerasetyp von großer Bedeutung zu sein. RICHTER fand bei Rekombinationsversuchen, daß aus Rattenleber isolierte saure Proteine die Transcriptionsaktivität der verbleibenden Matrize bei Anwendung von Coli-Polymerase steigerten, bei Verwendung der homologen Polymerase B jedoch hemmten.

Um die von BRESNICK, PIPER sowie in der vorliegenden Arbeit übereinstimmend erhobenen Befunde in dem oben dargelegten Sinne interpretieren zu können, mußte daher gesichert werden, daß sich die Ergebnisse bei Verwendung von zur Matrix homologen Polymerasen reproduzieren lassen.

Bei den dazu durchgeführten vergleichenden Versuchen wurden mit Rattenpolymerase A und Rattenpolymerase B qualitativ vollkommen identische, quantitativ noch deutlicher ausgeprägte Wirkungen erzielt als mit Coli-Polymerase. Die Transcriptionssteigerung von induziertem Chromatin betrug bei Einsatz von Coli-Enzym 25 %, bei Leberpolymerase A 39 % und bei Leberpolymerase B 56 %.

Zusammenfassend kann aus den Resultaten dieser Versuchsreihe sicher geschlossen werden, daß die durch Applikation von Phenobarbital induzierte Steigerung von Enzymsynthesen in der Leber und die damit einhergehende Lebervergrößerung initial nicht auf einer Vermehrung des Matrizenmaterials, sondern auf einer Erhöhung der Transcriptionsaktivität des präformierten Leberchromatins, wahrscheinlich aufgrund einer vermehrten Derepression von Genorten, beruht.

4.3. Untersuchungen zum molekularen Mechanismus der Phenobarbital-Induktion

Die abschließende, vorwiegend orientierende Versuchsreihe sollte Hinweise auf die molekularen Grundlagen der Transcriptionssteigerung erbringen.

Unsere Kenntnisse über die Regulationsmechanismen der Genfunktion bei Eukaryonten sind noch sehr lückenhaft. Vieles spricht dafür, daß sie über die bei Bakterien gefundenen Grundprinzipien der Bindung und Entfernung von Repressionsfaktoren verlaufen (JACOB und MONOD, 1961; KNIPPERS, 1971), doch ist die Natur dieser Repressoren noch weitgehend unbekannt. Nach der Beobachtung, daß die Matrizeneffektivität von Chromatin bei der Entfernung der Histone ansteigt und bei Rekombination *in vitro* wieder absinkt (HUANG und BONNER, 1962) wurde zunächst angenommen, daß die Repressoren zur Histongruppe gehören. Angesichts der geringen Zahl sowie der fehlenden Zell- und Artverschiedenheit der Histonproteine war auch unter Berücksichtigung nachgewiesener Modifikationsmöglichkeiten durch Phosphorylierung, Acetylierung oder Methylierung eine spezifische Repressionsfunktion nur schwer vorstellbar. Es wurde deshalb später angenommen, daß Histone die Funktion aller Gene unspezifisch hemmen und daß eine gerichtete Derepression spezifischer Geneorte durch die Wechselwirkung mit den sauren Nihthistonproteinen des Chromatins erreicht wird. (PAUL et al., 1968; GILMOUR et al., 1969).

Da nach vollständiger Extraktion aller Histone noch Nihthistonproteine an die DNS-Matrize assoziiert bleiben, durch deren Entfernung erst die maximale Transcriptionseffektivität erreicht wird, erscheint auch eine unmittelbare Repressionsfunktion der sauren chromosomalen Proteine alleine denkbar. (GILMOUR et al., 1969; SPELSBERG et al., 1971).

In einem dritten, von BONNER und Mitarbeitern entwickelten Konzept wird postuliert, daß die spezifische Regulation der Genaktivität über die Basensequenz kleiner chromosomaler

RNS-Moleküle mit etwa 40 Nucleotiden vermittelt wird. Diese "cRNS" ist über einen ungewöhnlich hohen Dihydrouridin-Anteil kovalent an Protein gebunden und hybridisiert sehr stark mit DNS. (BONNER et al., 1968).

Es ist experimentell gesichert, daß die Substratinduktion bei Bakterien und Eukaryonten auf der Bindung des Substrates an das Repressormolekül beruht (GILBERT et al., 1967).

Für einige Hormone, besonders Steroidhormone, wurde nachgewiesen, daß auch hier die Wirkung über eine primäre Aktivierung spezifischer Genorte erfolgt, der mit großer Wahrscheinlichkeit eine Wechselwirkung der Effektoren mit den Repressionsfaktoren zugrunde liegt.

Viele experimentelle Daten sprechen dafür, daß auch die Induktion von Leberenzymen durch Pharmaka und Fremdstoffe auf einer vermehrten Derepression der DNS-Matrize beruht. Aus der Beobachtung, daß nach Induktion mit Methylcholanthren eine Steigerung der Transcriptionsaktivität nur bei nativem Chromatin gefunden wird und daß sich durch Säureextraktion die Einbauraten von induziertem und Kontrollchromatin auf ein gleiches erhöhtes Niveau einstellen (BRESNICK, 1969; PIPER et al., 1968), folgte PIPER, daß die durch induzierende Pharmaka entfernten reprimierenden Faktoren basische Proteine darstellen. Diese Folgerung ist jedoch nicht sicher begründet, da bei der Säureextraktion mit den Histonen auch andere mögliche Repressoren wie saure Proteine und Ribonucleoproteide entfernt werden.

Bei den eigenen Versuchen wurde das gleiche Phänomen eines Anstiegs der Transcriptionsaktivität mit zunehmender Nivellierung von Kontroll- mit Phenobarbital-Chromatin bei längerer Aufbewahrung beobachtet. Die Aktivitätszunahme bei der Chromatinalterung beruht sehr wahrscheinlich auf dem Abbau von Histon-Proteinen durch Proteasen. (BARTLEY, 1970). Danach wäre eine Verminderung reprimierender Histon-Proteine als Ursache der Pharmakainduktion anzunehmen.

Da diese Proteine auch durch Detergentien wie Desoxicholsäure und Dodecylsulfat von der Matriz e abgelöst werden, ließen die Befunde daran denken, daß die Wirkung der Pharmaka unmittelbar über analoge physikalisch-chemische Mechanismen erfolgt. Als einzige stoffliche Gemeinsamkeit besitzen diese sehr heterogenen Fremdstoffe polar-unpolare Moleküleigenschaften, die Grundlage einer Detergenswirkung sein könnten. Aus Modellversuchen ist außerdem bekannt, daß derartige Substanzen den Quellungsgrad von Proteingelen stark herabsetzen (SEELISCH, 1941). Es erscheint danach durchaus möglich, daß die induzierenden Substanzen aufgrund ihrer physikalisch-chemischen Eigenschaften reprimierende Proteine von der Matriz e ablösen oder durch Konfigurationsänderung ihre Hemmfunktion aufheben.

Eine derartige, völlig unspezifische, direkte Beeinflussung der Matriz e konnte in Versuchen sicher ausgeschlossen werden, bei denen Phenobarbital verschiedener Konzentrationen einem in vitro Transcriptions-System zugesetzt wurde. Die Erhöhung der RNS-Synthese in der pharmakainduzierten Leber mußte demnach sekundär über zelluläre Regulationen vermittelt werden. Es könnte sich dabei um stoffliche Faktoren oder um funktionelle Prinzipien handeln. Dem initialen Wirkungsort der Pharmaka entsprechend war anzunehmen, daß diese im Cytoplasmaraum lokalisiert sind oder von cytoplasmatischen Reaktionen ausgehen. Das Cytoplasma von Leberzellen enthält in der Regenerationsphase nach Teilhepatektomie eine Komponente, die bei in vitro-Inkubation die Transcription normaler Leberzellkerne steigert (THOMPSEN, 1968). GEIBEL fand eine Erhöhung der in vitro-RNS-Synthese in Zellkernen unbehandelter Tiere bei Zugabe von Cytoplasma induzierter Leberzellen. Bei analogen Versuchen mit isoliertem Chromatin konnte in unserem Transcriptionssystem eine entsprechende Wirkung nicht nachgewiesen werden. SEIFART et al. (1973) isolierten aus Cytoplasma eine transcriptionsstimulierende Proteinfraction, die nur bei Anwendung von Leberpolymerase B, nicht bei Verwendung anderer Polymerasen den Einbau markierter Nucleotide erhöhte. Da bei unseren Untersuchungen über die Cytosolwirkung auf Chromatin Coli-Polymerase verwandt wurde, bei den Kernversuchen jedoch

endogene Polymerase B zur Verfügung stand, müssen weitere Analysen klären, ob die Verschiedenheit der Polymerasen für die Divergenz der Ergebnisse verantwortlich ist. Abgesehen von dieser im methodischen Bereich liegenden Deutungsmöglichkeit ist es jedoch sehr wohl denkbar, daß die nur bei intakten Kernen gefundene Stimulierung der RNS-Synthese durch Cytosol aus induzierter und regenerierender Leber Ausdruck der biologischen Wirkungsweise ist. Der beobachtete Cytosoleffekt muß nicht unbedingt auf einer direkten Wechselwirkung von cytoplasmatischen stofflichen Faktoren mit dem genetischen Material des Zellkerns beruhen, sondern kann ebenso von Funktionseigenschaften des Cytoplasmas ausgehen und über die Beeinflussung von Kernfunktionen verlaufen.

Eine metabolische Initialwirkung aller enzyminduzierenden Pharmaka besteht in der starken Aktivierung und Induktion mikrosomaler und cytoplasmatischer NADP·H-verbrauchender Enzyme, die zu einer ausgeprägten Positivierung des cytoplasmatischen $\text{NADP}^+/\text{NADP}\cdot\text{H}$ -Systems führt. Über eine Abhängigkeit des Transcriptionsprozesses von dem Potential biologischer Redoxsysteme liegen nur wenige experimentelle Daten vor. Nachgewiesen wurde lediglich eine geringe Aktivierung durch physiologische Reduktionsstoffe wie Glutathion, die auf der Stabilisierung und Regeneration von SH-Gruppen beruht. Die Aktivität der RNase setzt umgekehrt die Existenz von Disulfid-Brücken voraus und wird durch deren Reduktion zu SH-Gruppen aufgehoben. SH-Gruppen reduzierende Substanzen erhöhen also die meßbare Transcriptionsrate durch die synergistische Wirkung von Synthesesteigerung und RNase-Hemmung. Die Beeinflussung der RNS-Synthese in vitro durch andere physiologische Redoxsysteme und durch Redoxindikatoren kann sicher zu einem großen Teil auf die gleichen Mechanismen zurückgeführt werden. Durch Zugabe von NADP^+ und den positiven Redoxindikatoren Dichlorphenolindophenol und Methylenblau zum Synthesystem wurde die Einbaurate von ^{14}C -UTP gehemmt, durch Glutathion und $\text{NADP}\cdot\text{H}$ gesteigert. Eine unmittelbare Beeinflussung des Transcriptionsprozesses durch die Veränderung der

zellulären Redoxlage konnte nach diesen Befunden sicher nicht die Ursache der erhöhten RNS-Synthese in der induzierten Leber sein. Die ausgeprägte Positivierung des $\text{NADP}^+/\text{NADP}\cdot\text{H}$ -Systems in der initialen Induktionsphase hätte nach diesen Befunden eine Hemmung zur Folge haben müssen.

Eine noch weitgehend hypothetische Möglichkeit eines mittelbaren Eingriffs der $\text{NADP}^+/\text{NADP}\cdot\text{H}$ -Redoxlage in die Steuerung der RNS-Synthese eröffnete das bereits dargelegte, von BONNER et al. entwickelte Konzept einer spezifischen Genregulation durch dihydrouracilreiche chromosomale RNS-Moleküle. Da bei der Pharmakainduktion als Folge der stark verminderten $\text{NADP}\cdot\text{H}$ -Gehalte die Aktivität der Uracilreduktase teilweise bis zum völligen Verlust abfällt, schien es denkbar, daß über eine verminderte Bildung oder Funktion dieser chromosomalen RNS ein Eingriff in die Transcriptionsregulation erfolgt. Die Existenz dieser spezifischen chromosomalen RNS mit Regulationseigenschaften ist z. Z. noch umstritten. Die mit chromosomalen Proteinen assoziierte RNS wird von ARTMAN et al. (1971) als Präparationsartefakt angesehen, von anderen Untersuchern wird angenommen, daß es sich bei der cRNS um bei der Pronasebehandlung degradierte tRNS handelt. (v. HEYDEN und ZACHAU, 1971). Untersuchungen über Gehalt und Eigenschaften der chromosomalen RNS während der Pharmakainduktion waren deshalb nicht nur wegen des diskutierten möglichen Zusammenhangs von Interesse, sondern sie schienen auch geeignet, experimentelle Hinweise auf die Realität des BONNERSchen Regulationskonzeptes zu geben.

Bei den Analysen konnte bei Einhaltung der von BONNER et al. angegebenen Verfahren regelmäßig aus Chromatin eine niedermolekulare RNS isoliert werden, die bei Chromatographie über DEAE-Sephadex, Dichtegradienten-Zentrifugation, Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Chromatographie über Methylalbuminkieselgur die für cRNS angegebenen Charakteristiken besaß.

Auch der die chromosomale RNS kennzeichnende hohe Gehalt an Dihydrouracil wurde in diesen Fraktionen gefunden. Der molare Dihydrouracilanteil schwankte innerhalb eines weiten Bereichs und erreichte nur in einigen Präparationen die von BONNER et al. für andere Gewebe angegebenen Werte von 9 mol % (JACOBSON and BONNER, 1968; HUANG and BONNER, 1965; HUANG, 1969). Mit einem mittleren Gehalt von 5 - 6 mol % lag der Dihydrouracilanteil "proteingebundener" cRNS jedoch auch bei unseren Analysen deutlich über dem von tRNS. Auch die in unseren Versuchen bei unbehandelten Mäusen ermittelten "cRNS"-Gehalte lagen in der von diesen Autoren angegebenen Größenordnung. Chromatin von 1 g Leber enthielt 0,14 mg RNS, davon 0,044 mg der fest mit Protein assoziierten Form, die bei CsCl-Zentrifugation an das auf dem Gradienten flotierende Proteinhäutchen gebunden bleibt. Die Angabe, daß aus Leberchromatin durch eine der CsCl-Zentrifugation vorausgehende Behandlung mit 15 mM DOC eine mehrfach höhere Quantität an nicht-gebundener cRNS freigesetzt werden kann, konnte bei unseren Versuchen nicht bestätigt werden. In der induzierten Leber war innerhalb eines großen Schwankungsbereiches der Anteil an proteingebundener cRNS erniedrigt und der der DOC-extrahierbaren freien cRNS erhöht; die Gesamtgehalte blieben dabei annähernd gleich. Die Dihydrouracil-Konzentrationen lagen bei beiden Fraktionen im Bereich der bei unbehandelten Tieren gefundenen Werte.

Die Ausgangsfrage dieser Versuchsreihe, ob die Positivierung der Redoxlage des $\text{NADP}^+/\text{NADP}\cdot\text{H}$ -Systems über die nachgewiesene Verminderung der Pyrimidinreduktion den Dihydrouracilanteil der cRNS und damit deren postulierte Regulationsfunktion beeinflussen kann, muß nach diesen Befunden verneint werden.

Die zweite Frage nach der Existenz einer spezifischen cRNS und nach ihrer möglichen Funktion konnte nicht eindeutig geklärt werden. Da Kontroll- und Phenobarbitalkollektive gleichzeitig und in vollkommen identischer Weise präpariert

wurden, konnten die unterschiedlichen Gehalte an "gebundener" und "freier" cRNS nicht mit den von ARTMAN angenommenen Extraktionsartefakten erklärt werden. Daß es sich bei der cRNS um neu synthetisierte, noch an dem DNP-Komplex haftende Funktions-RNS handelt, ist unwahrscheinlich. Die noch im Kern befindliche neusynthetisierte RNS wird schon bei der Chromatin-Präparation größtenteils durch die mehrfache Extraktion mit Tris-Puffer pH 8.0 entfernt. Der verbleibende Rest sedimentiert bei der CsCl-Zentrifugation. In der induzierten Leber ist der hohen Syntheseintensität entsprechend diese pelletierte RNS-Fraktion erhöht, während umgekehrt der gebundene cRNS-Anteil herabgesetzt ist. Bei der Identität beider RNS-Formen könnte diese Divergenz nur mit einer Veränderung der Bindungseigenschaften erklärt werden. Das gleiche gilt auch für die Annahme, daß es sich dabei um tRNS handelt. Nach diesen Überlegungen stehen die Befunde im Einklang mit der von BONNER entwickelten Hypothese, daß es sich bei der chromosomalen RNS um eine besondere RNS-Klasse handelt. Zur weiteren Beurteilung der Realität dieser Annahme wurde die Frage nach einer spezifischen Funktion bei der Transcriptionsregulation geprüft.

Die ursprüngliche Vorstellung BONNERS war, daß die cRNS durch Hybridisierung mit komplementären DNS-Abschnitten die spezifische Repression bestimmter Genabschnitte bewirkt. Aus späteren Untersuchungen wurden weitere Möglichkeiten einer Transcriptionsregulation abgeleitet.

Die in den eigenen Versuchen beobachtete Erniedrigung der Gehalte an gebundener cRNS in induziertem Chromatin mit erhöhter RNS-Syntheseaktivität sprechen für die erste Annahme einer Repressionsfunktion. In Rekombinationsversuchen wurde deshalb geprüft, ob die erhöhte Matrizeneffektivität von induziertem Chromatin durch in vitro-Zugabe der aus Kontroll-Chromatin isolierten cRNS-Fraktionen wieder gesenkt werden konnte. Diese Untersuchungen erbrachten jedoch keine einheitlichen und sinnvoll in ein Konzept einzuordnende Ergebnisse.

Es konnten weder systematische Wirkungen der einzelnen cRNS-Fraktionen induzierter und unbehandelter Tiere noch die zu fordernde Abhängigkeit einer Wirkung von Funktionszustand und Typ der verwendeten Matrize nachgewiesen werden. Diese negativen Resultate der Rekombinationsversuche beweisen jedoch noch nicht sicher, daß die cRNS keine spezifische Regulationsfunktion besitzt. Es ist denkbar, daß unter unseren experimentellen Bedingungen verschiedene, die Transcriptionsrate gegensätzlich beeinflussende Faktoren eine vorhandene systematische Wirkung überlagern. Von Bedeutung könnten ebenso eine unspezifische Hemmung der Transcription (TISSIERES et al., 1963) wie eine gegensinnig wirkende Sättigung von Nucleasen durch die zugesetzte niedermolekulare RNS sein.

Von grundlegendem Einfluß kann weiterhin der schon erwähnte Nachweis sein, daß bei quantitativen Transcriptionsversuchen die Wirkungsrichtung möglicher Regulationsfaktoren von der Art der verwendeten Polymerase abhängt. Um eine sichere Aussage zu erhalten, müssen die Rekombinationsversuche deshalb mit der zur Matrize homologen Polymerase unter Bedingungen wiederholt werden, die auch die übrigen unspezifischen Wirkungen ausschalten.

Z u s a m m e n f a s s u n g

Die Induktion der endoplasmatischen Metabolisierungsenzyme der Leber durch Phenobarbital und andere Pharmaka hat eine auf der vermehrten Synthese extramikrosomaler Enzyme beruhende Organvergrößerung zur Folge. Aufgabe der vorliegenden Arbeit war es, durch Untersuchungen von Chromatin nach Induktion in vivo und Zusatz möglicher Induktionsfaktoren in vitro Hinweise auf die molekularen Mechanismen dieses Phänomens zu erhalten.

Dazu wurde bei männlichen NMRI-Mäusen in verschiedenen Stadien der Induktion durch Phenobarbital nach einer modifizierten Methode von MAYFIELD und BONNER (1971) Leberchromatin isoliert und gereinigt. Durch quantitative Analyse von DNS, RNS, Histon- und Nichthiston-Proteinen wurden Chromatin-Gesamtgehalte und Zusammensetzung mit Hilfe von alkalischer Saccharose-Gradientenzentrifugation und thermischer Denaturierung Struktureigenschaften und in einem in vitro-System unter Verwendung von E. coli Polymerase sowie Rattenleberpolymerase A und B die Matrizenfunktion bestimmt.

Folgende Ergebnisse wurden erhalten:

1. Bei 168 unbehandelten NMRI-Mäusen wurde mit einer Ausbeute von 63 % Chromatin isoliert, das bezogen auf DNS folgende Zusammensetzung besaß: DNS = 1, RNS = 0,12, Nichthiston- = 0,74 und Histon-Protein = 0,97, Gesamtprotein = 1,56.

Die Analyse des im Mittel 37 % betragenden nicht sedimentierenden Desoxinucleoproteid-Anteils ergab, daß dieses "Überstandschromatin" eine mehrfach höhere Transcriptionsaktivität besaß als die Fraktion des sedimentierenden "Rohchromatins". Vergleichende Untersuchungen der Struktur beider Chromatinfractionen mittels Ultrazentrifugation und Ultrafiltration, thermischer Denaturierung und Sedimentation im alkalischen Saccharose-Dichtegradienten zeigten, daß es sich bei dem Überstandschromatin um niedriger molekulare, vermehrt dereprimierte

Chromatinformen handelt. Möglicherweise enthält diese Überstandsfraktion vorwiegend die in vivo funktionsaktiven, de-reprimierten Genanteile.

2. Bei Induktion mit Phenobarbital lagen die Chromatingehalte sowohl bei Bezug auf 1 g Leber als auch auf die Gesamt-Leber in der initialen Induktionsphase mit Ausnahme einer vorübergehend geringen Erhöhung im Bereich der Norm. Erst vom 2. Induktionstag ab stiegen die Gesamtgehalte der Organvergrößerung annähernd parallel laufend an. Der Anteil an nicht sedimentierendem Überstandschromatin war dabei zu allen Zeitpunkten der Untersuchungen deutlich erhöht.

Als wesentliches Ergebnis der Arbeit konnte sicher nachgewiesen werden, daß die spezifische Einbauaktivität der DNS-Matrixe aus induzierter Leber erhöht war. Eine Transcriptionssteigerung war schon nach 12-stündiger Inkubationszeit, zum Zeitpunkt der Induktion der mikrosomalen Metabolisierungsenzyme nachweisbar und erreichte ein Maximum nach 36 - 48 Std. zum Zeitpunkt der erhöhten Synthese der umfangreichen Gruppen cytoplasmatischer und mitochondrialer Enzyme. Bei einem Kollektiv von 223 Tieren wurde eine durchschnittliche Steigerung von 25 % ermittelt. Bei orientierenden Versuchen mit Rattenleberchromatin als Matrix wurde eine nahezu identische Steigerung der Matrizenaktivität gefunden. Bei Einsatz der zur Matrix homologen nucleolaren und nucleoplasmatischen Leberpolymerasen A und B wurden qualitativ vollkommen identische, quantitativ noch deutlicher ausgeprägte Wirkungen erhalten.

Die Charakteristik der thermischen Denaturierungskurven deuteten darauf hin, daß das Chromatin während der Enzyminduktion einen geringeren Anteil an matrizengebundenen Proteinen aufweist.

3. a) Durch in vitro-Zusatz von Phenobarbital in Konzentrationen von 10^{-3} - 10^{-8} zu Leberchromatin von unbehandelten Tieren konnte die Transcriptionsrate nicht gesteigert werden.

b) Im Gegensatz zu Untersuchungen mit isolierten Kernen bewirkte Zugabe von Cytosol aus Leber induzierter Tiere zu Chromatin keine Steigerung der Transcriptionsrate.

c) Eine Bedeutung der bei Pharmakainduktion initial auftretenden Positivierung der zellulären Redoxlage für die Transcriptionssteigerung konnte ausgeschlossen werden. Im in vitro-System wurde die Transcriptionsintensität durch oxidierende Redoxsubstanzen und durch NADP^+ erniedrigt, durch reduzierende Stoffe, wie Glutathion und $\text{NADP}\cdot\text{H}$, erhöht.

e) Aus Chromatin unbehandelter und induzierter Tiere wurde eine niedermolekulare RNS mit den für cRNS angegebenen Charakteristiken, wie Größe und hoher Dihydrouridingehalt isoliert. Die Gehalte an "gebundener cRNS" waren in induziertem Chromatin gering erniedrigt, der Dihydrouracilgehalt unverändert. Aus Rekombinationsversuchen konnte aufgrund der uneinheitlichen Resultate die Möglichkeit einer spezifischen Genregulation durch chromosomale RNS-Fractionen und deren Bedeutung für die Pharmakainduktion nicht sicher beurteilt werden.

L i t e r a t u r v e r z e i c h n i s

1. ARIAS, J.M., D. DOYLE and R.T. SCHIMKE,
J. Biol. Chem. 244, 3303 (1969)
2. ARNOLD, E.A. and K.E. YOUNG,
Biochim. Biophys. Acta 269, 252 (1972)
3. ARTMAN, M., J.S. ROTH,
J. Mol. Biol. 60, 291 (1971)
4. BARTLEY, J. and CHALKLEY, R.,
J. Biol. Chem. 245, 4286 (1970)
5. BEISENHERZ, G., H.J. BOLTZE, Th. BÜCHER, R. CZOCK,
K.H. GARBADE, E. MAYER-ARENDT und
G. PFLEIDERER,
Z. f. Naturf. 8 b, 10, 555 (1953)
6. BENJAMIN, W., A. LEVANDER, A. GELLHORN and R.H. de BELLIS,
Biochemistry 55, 858 (1966)
7. BLATTNER, F.R. und H.P. ERICKSON,
Anal. Biochem. 18, 220 (1967)
8. BONNER, J. and J. WIDHOLM,
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 57, 1379 (1967)
9. BONNER, J., M.E. DAHMUS, D. FAMBROUGH, R.C. HUANG,
K. MARUSHIGE and D. TUAN,
Science 159, 47 (1968)
10. BRAY, G.A., Anal. Biochem. 1, 279 (1960)
11. BRESNICK, E., Mol. Pharmakol., 2, 406 (1966)
12. BRESNICK, E., H. MOSSE, Mol. Pharmakol. 5, 219 (1969)
13. BRESNICK, E., Proc. of the IV. Internat. Congress on
Pharmacol., Basel 1969 (Schwabe & Co.
Publishers, Basel/Stuttgart) Vol. IV,
349 (1970)
14. BURTON, K., Biochem. J. 62, 315 (1956)
15. BUTTERWORTH, P.H.W., R.F. COX, C.J. CHESTERTON,
Eur. J. Biochem. 23, 229 (1971)
16. CHAMBERLIN, M. and P. BERG,
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 48, 81 (1962)

17. DAHMUS, M.E. and D.J. McCONNELL,
Biochemistry 8, 1524 (1969)
18. DAHMUS, M.E. and J. BONNER,
Fed. Proc. 29, 1255 (1970)
19. DOUNCE, A.L., WITTER, R.F., MONTY, K.J., PATE, S. and
COTTONE, M.A.,
J. Biophys. Biochem. Cytol. 1, 139 (1955)
20. GEIBEL, U., Med. Diss. Marburg 1971
21. GELBOIN, H.V., J.S. WORTHAM and R.G. WILSON,
Nature 214, 281 (1967)
22. GELBOIN, H.V., L.R. YOUNGER, D.W. NEBERT and J.M. MILLER,
Proc. of the IV. Internat. Congress on
Pharmacol., Basel 1969 (Schwabe & Co.
Publishers, Basel/Stuttgart), Vol. IV,
287 (1970)
23. GILBERT, W., B. MULLER-HILL, Proc. Nat. Acad. Sci. USA,
58, 2415 (1967)
24. GILMOUR, R.S., J. PAUL, J. Mol. Biol. 40, 137 (1969)
25. GREIM, H. and H. REMMER, Proc. of the IV. Internat. Congress
on Pharmacol., Basel 1969 (Schwabe & Co.
Publishers, Basel/Stuttgart), Vol. IV,
340 (1970)
26. v.HEYDEN, H.W., H.G. ZACHAU, Biochim. Biophys. Acta 232, 651
(1971)
27. HUANG, R.C.C., Biophys. J. Soc. Abstracts 9, A86 (1969)
28. HUANG, R.C.C. , J. BONNER, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 54,
960 (1962)
29. HUANG, R.C.C. and J. BONNER, Proc. Nat. Acad. Sci. USA,
54, 960 (1965)
30. HUANG, R.C.C. and P.C. HUANG, J. Mol. Biol. 39, 365 (1969)
31. HURWITZ, J., J.J. FURTH and M. ANDERS,
J. Biol. Chem. 237, 2611 (1962)
32. JACOB, F. and J. MONOD, J. Molecular Biol. 3, 318 (1961)
33. JACOBSON, R.A. and J. BONNER, J. Biochem. Biophys. Res.
Commun. 33, 716 (1968)
34. JACOBSON, R.A. and J. BONNER, Arch. Biochem. Biophys.
146, 557 (1971)

35. KARLSON, P., Dtsch. med. Wschr. 86, 668 (1961)
36. KARLSON, P. and C.E. SEKERIS, Acta Endocrinol. 53, 505 (1966)
37. KIRSECK, B., Med. Diss. Marburg 1971
38. KNIPPERS, R., Molekulare Genetik, Thieme Verlag, Stuttgart 1971
39. KORANSKY, W. and R. SCHULTE-HERMANN,
Proc. of the IV. Internat. Congress on
Pharmacol., Basel 1969 (Schwabe & Co.
Publishers, Basel/Stuttgart), Vol. IV,
277 (1970)
40. KUNZ, W., G. SCHAUDE, H. SCHIMASSEK, W. SCHMID and M. SIESS,
Proc. Europ. Soc. Study Drug Toxicity,
7, 138 (1966)
41. KUNZ, W., G. SCHAUDE, W. SCHMID and M. SIESS, 1966 (I)
Excerpta Medica International Congress
Series No. 115
Vol. VII of Proceedings of the European
Society for the Study of Drug Toxicity,
Meeting in Rome, Italy, Jan. 1966
42. KUNZ, W., G. SCHAUDE, H. SCHIMASSEK, W. SCHMID and M. SIESS
1966 (II)
Excerpta Medica International Congress
Series No. 115
Vol. VII of Proceedings of the European
Society for the Study of Drug Toxicity,
Meeting in Rome, Italy, Jan. 1966
43. KUNZ, W. and B. SCHNIEDERS, Proc. of the IV. Internat.
Congress on Pharmacol., Basel 1969 (Schwabe
& Co. Publishers, Basel/Stuttgart), Vol. IV,
326 (1970)
44. KURIYAMA, Y., T. OMURA, P. SIEKEVITZ and G.E. PALADE,
J. Biol. Chem. 244, 2017 (1968)
45. LOENING, U.E., Biochem. J. 102, 251 (1967)
46. LOWRY, O.H., N.J. ROSE BROUGH, A.L. FARR, R.J. RANDALL,
J. Biol. Chem. 193, 265 (1951)
47. MADIX, J.C., BRESNICK, E., Biochem. Biophys. Commun.
28, 445 (1967)
48. MAGRATH, D.I. and D.C. SHAW, Biochem. Biophys. Commun.
26, 32 (1967)
49. MANDELL, J.O. and J.A. HERSHEY, Biochemistry 1, 66 (1960)

50. MARUSHIGE, K. and J. BONNER, J. Mol. Biol. 15, 160 (1966)
51. MARUSHIGE, K. and J. BONNER, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 68, 2941 (1971)
52. MAYFIELD, J.E. and J. BONNER, Proc. Nat. Acad.Sci. USA 68, 2652 (1971)
53. MAYFIELD, J.E. and J. BONNER, Proc. Nat. Acad.Sci. USA 69, 7 (1972)
54. MEYBAUM, W., Z. Physiol. Chem. 238, 117 (1939)
55. MIEHE, H., Med. Diss. Marburg 1967
56. MÖCKEL, H., Med. Diss. Marburg 1969
57. OBERDISSE, E., C. HOCHSTRATE and H.-J. MERKER,
Proc. of the IV. Internat. Congress on
Pharmacol., Basel 1969 (Schwabe & Co.
Publishers, Basel/Stuttgart), Vol. IV,
318 (1970)
58. PALM, D., C. ERNZERHOFF and P. HOLTZ,
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmak.und
exp. Path. 258, 352 (1967)
59. PAUL, J., R.S. GILMOUR, J. Mol. Biol. 34, 305 (1968)
60. PERAINO, C. and H.C. PITOT, J. Biol. Chem. 239, 4308 (1964)
61. PIPER, W.N. and W.F. BOUSQUET, Biochem. Biophys. Res.
Commun. 33, 602 (1968)
62. RÄKER, K.-O., Med. Diss. Marburg 1966
63. REICHWEIN, I., Unveröffentlichte Ergebnisse, Marburg 1973
64. RICHTER, K.H., Med. Diss. Marburg 1972
65. van der SCHANS, G.P., J.B.T. ATEN and J. BLOK,
Anal. Biochem. 32, 14 (1969)
66. SCHAUDE, G., Med. Habil. Marburg 1972
67. SCHIMKE, T., R. GANSCHOW, D. DOYLE and I.M.ARIAS,
Fed. Proc. 27, 1223 (1968)
68. SCHLICHT, I., W. KORANSKY, S. MAGOUR and R. SCHULTE-HERMANN,
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path.
Pharmakol. 261, 26 (1968)
69. SCHULZ, W., Med. Diss. Marburg 1967
70. SEELISCH, F., Ergebn. d. Physiol. 44, 466 (1941)

71. SEIFART, K.H., P.P. JUHASZ and B.J. BENECKE,
Europ. J. Biochem. 33, 181 (1973)
72. SEKERIS, C.E. and P.P. DUKES, Z. Physiol. Chem. 341,
49 (1965)
73. SHIH, T.Y. and R.S. LAKE, Biochemistry 11, 4811 (1972)
74. SHUSTER, L. and H. JICK, J. Biol. Chem. 241, 5361 (1966)
75. SPELSBERG, T.C., L.S. HNILICA, Biochim. Biophys. Acta
228, 202 (1971)
76. THOMPSON, L.R. and B.J. MCCARTHEY, Biochem. Biophys.
Res. Commun. 30, 166 (1968)
77. TISSIERES, A., S. BOURGEOIS, F. GROS,
J. Mol. Biol. 7, 100 (1963)
78. ZILLIG, W., E. FUCHS and R. MILLETTE,
Procedures in Nucleic Acid Research,
Ed.: G.L. Cantoni and D.R. Davies,
Harper and Row, New York 1966

L e b e n s l a u f

Am 14.9.1944 wurde ich als Sohn des Stabsintendanten Hermann Mierau und seiner Ehefrau Anneliese, geb. Hundertmark, in Bad Wildungen geboren.

Nach dem Besuch der Grundschule und des Wilhelm-Gymnasiums in Kassel bestand ich am 6.2.1964 das Abitur. Am 1.4.1964 trat ich in die Engel-Apotheke, Kassel, als Apothekerpraktikant ein, um die für das Studium erforderliche Praktikantenzeit zu absolvieren.

Nach dem Bestehen der pharmazeutischen Vorprüfung am 22.3.1966 begann ich im Wintersemester des gleichen Jahres mit dem Pharmaziestudium an der Philipps-Universität Marburg, wo ich am 10.10.1969 das Staatsexamen ablegte.

Vom 5.1.1970 bis 28.2.1971 arbeitete ich am Institut für Pharmazeutische Technologie der Philipps-Universität Marburg, wo ich mich sowohl theoretisch als auch praktisch auf dem Gesamtgebiet der pharmazeutischen Technologie, insbesondere der Herstellung steriler Augenarzneien, fortbildete.

Im Sommersemester 1971 begann ich mit dem Ergänzungsstudium der Humanbiologie mit Hauptfach Pharmakologie. Seit dem 1.3.1971 (ab 1.11.1971 als wissenschaftlicher Angestellter) arbeite ich am Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Philipps-Universität Marburg, wo ich auch meine Dissertationsarbeit ausführte.

Meine Approbation als Apotheker erhielt ich am 24.11.1971.

Marburg, im Dezember 1973

Meine akademischen Lehrer waren die Herren Professoren
und Dozenten:

Beier, Böhme, Braun, Cramer, Dimroth, Ebel, Führer, Haake,
Hartke, Hensel, Heubel, Ihm Kating, Karlson, Koransky,
Krüpe, Kunz, List, Lohmann, Mahr, Neidlein, Nöth, Nürnberg,
Nultsch, Otto, Petry, Pollmann, Portig, Schiff, Schmid,
Schmitz, Siess, Stamm, Theile, Unterhalt, Vogel, Walcher,
Wendt.

A d d e n d u m

Diese Arbeit ist das Ergebnis einer mehrjährigen Tätigkeit am Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Universität Marburg, Lahnberge, und wurde von Herrn Prof. Dr. W. Kunz angeregt und gefördert. Für seine Anteilnahme und Unterstützung möchte ich ihm herzlichst danken.

Ebenso danke ich Herrn Prof. Dr. W. Schmid für die Übernahme des Correferates.

Besonderen Dank schulde ich Herrn Dr. A. Rickart, mit dessen Hilfe in stets freundschaftlicher Zusammenarbeit die Isolierung der cRNS und die quantitativen Bestimmungen des Dihydrouracil-Anteils durchgeführt wurden.

Fräulein B. Sckeyde, Frau H. Radler und Frau M. Sohn danke ich für die gewissenhafte technische Assistenz.

